

Norges Fiskerihøgskole

Betydning av Stress ved Badevaksinering av Lakseyngel mot Yersiniose (*Yersinia ruckeri*).

Anniken Malene Frantzen Sørflaten

Masteroppgave Fiskehelse (60 studiepoeng)

Desember 2013

Betydning av Stress ved Badevaksinering av Lakseyngel mot Yersiniose

Anniken Malene Frantzen Sørflaten
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
Universitetet i Tromsø

Desember 2013

Sammendrag

Yersiniose (rødmunnssyke) skyldes bakterien *Yersinia ruckeri*, og utbrudd av sykdommen er ofte forbundet med stress. De fleste tilfellene av Yersiniose blir påvist i settefiskfasen. Et av de beste forebyggende tiltakene mot sykdommen er vaksinering. Det er ikke praktisk å vaksinere små fisk, og derfor er immersjonsvaksiner det beste alternativet.

I dette prosjektet utførte vi et forsøk der små yngel ble badevaksinert 2 ganger med en autogen ERM vaksine bestående av formaldehydinaktivert kultur av *Yersinia ruckeri* (serotype 01). Mellom 1. gangs og 2. gangs badevaksinering var det 500 døgngrader (vanntemperatur var 12 – 14°C gjennom forsøket). Formålet med dette forsøket var å undersøke om en lav dose Aqui-S (2.5 mg/l isoeugenol) hadde en effekt på stressresponsen målt som kortisolnivå, og om en eventuell stressreduksjon forårsaket av Aqui-S kunne påvirke immunresponsen. Kortisolnivået ble målt før vaksinering (pre-stress), og opp til 48 timer etter vaksinering, både ved 1. og 2. gangs badevaksinering. Dette ble målt ved RIA (radioimmunoassay). Immunresponsen til badevaksineren ble analysert som uttrykket av interleukinene IL-1 β og IL-17 α , samt produksjonen av spesifikke antistoffer for *Yersinia ruckeri*. Prøver av gjeller og hodenyre for RT-PCR (real time PCR) ble tatt 1 og 3 dager etter 1. gangs badevaksinering. Antistoffresponsen ble målt ved ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 500 døgngrader etter 2. gangs badevaksinering.

Resultatene viser at en sedativ dose Aqui-S ikke har tilstrekkelig effekt på kortisolnivået hos lakseyngel. Det ble også vist at fisk som ikke ble sedert med Aqui-S generelt hadde en høyere immunrespons.

Takk

Denne oppgaven ble utført i samarbeid med Laksefjord AS og Pharmaq. Selve forsøket ble utført ved Mørkvedbukta forskningsstasjon (universitetet i Nordland). Halvparten av labarbeidet ble gjort ved Mørkvedbukta forskningsstasjon, mens den andre halvparten ble utført hos Pharmaq i Oslo.

Først vil jeg takke mine veiledere, Børge Nilsen Fredriksen, Ingvill Jensen og Martin Haugmo Iversen. Spesielt vil jeg rette en stor takk til Børge som gav meg ufattelig god hjelp på slutten. Uten din hjelp ville ikke oppgaven blitt det samme. Tusen takk!

Så vil jeg takke Hilde Ribe som for mange år siden fikk meg med på et stressprosjekt, og dermed gjorde at jeg ble bitt av “stressbasillen”. Takk for all hjelpen med prosjektet og for at du tok vare på meg de gangene jeg var i Bodø.

Takk til Bente Sunde og Tove Hansen for god hjelp på laben. Og takk til Svein Alexandersen og min søster Elisabeth som tok seg tid til å lese gjennom oppgaven.

Til slutt vil jeg takke venner og familie for god støtte i denne perioden. Spesielt vil jeg takke Daniel, som ikke bare lærte meg å bruke L^AT_EX slik at oppgaven ser fantastisk ut, men som også alltid var der.

Innhold

1	Introduksjon	1
1.1	Yersiniose	1
1.2	Vaksinasjon som Forebyggende Tiltak mot Sykdom	2
1.2.1	Vaksintyper	3
1.2.2	Vaksinasjonsmetoder	3
1.3	Immunforsvaret	4
1.3.1	Det Medfødte Immunforsvaret	5
1.3.2	Det Adaptive Immunforsvaret	7
1.4	Stress	10
1.4.1	Akutt og Kronisk Stress	11
1.4.2	Klassifisering av Stressresponser	11
1.4.3	Den Endokrine Stressresponsen	11
1.4.4	Kortisol som Indikator på Stress	14
1.4.5	Effekter av Stress på Immunforsvaret	14
1.5	Anestesi	16
1.5.1	Aqui-S™	16
1.5.2	Metomidat	17
1.6	Problemstilling	17
2	Materiale og Metoder	19
2.1	Forsøksfisk	19
2.2	Forsøksoppsett	20
2.3	Badevaksinering	20
2.4	Isolasjon av RNA	21
2.5	Kvantitering av RNA	22
2.6	cDNA-syntese	22
2.7	RT-PCR	22
2.8	Indirekte ELISA	23
2.9	Ekstraksjon av Kortisol	24
2.10	RIA	24
2.11	Statistisk Analyse	25
2.11.1	Kortisol	25
2.11.2	RT-PCR	25

3 Resultater	27
3.1 Observasjoner	27
3.2 Stressrespons Under Vaksinerings	27
3.3 Immunrespons	29
3.3.1 Interleukinrespons	29
3.3.2 Antistoffrespons	32
4 Diskusjon	33
4.1 Kortisol	33
4.2 Praktisk Bruk av Aqu-S	35
4.3 Immunrespons	35
4.3.1 Interleukinrespons	36
4.3.2 Antistoffrespons	37
4.4 Konklusjon	38
A Resultater	55
A.1 Interleukinrespons	55
B Nøkkeldata Forsøk	61
B.1 Snittvekter	61
B.2 Antall Fisk Brukt til Kortisolanalysering	62

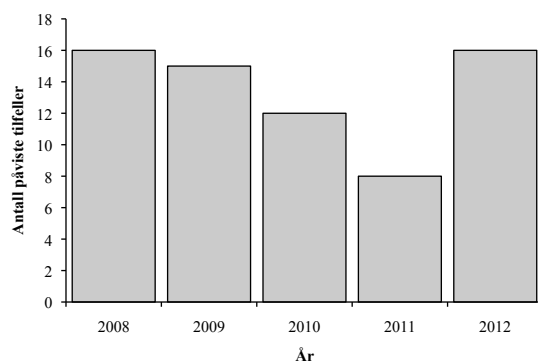
Kapittel 1

Introduksjon

1.1 Yersiniose

Yersiniose (rødmunnssyke, red mouth disease) er en sykdom som kan gi økt dødelighet hos laks og regnbueørret, både i settefiskfasen og etter utsett i sjø [69, 56]. Sykdommen skyldes bakterien *Yersinia ruckeri* som er en Gram negativ stavbakterie, som kan være bevegelig eller ubevegelig [30]. Det finnes to serotyper av *Yersinia ruckeri*, 01 og 02 [102, 30]. *Yersinia ruckeri* ble først isolert fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) i ferskvannsoppdrett i Hagerman valley i Idaho, USA, på 1950-tallet [134]. I Europa ble bakterien første gang isolert på 1970-tallet [102]. Antall påviste tilfeller av Yersiniose i Norge de siste årene er vist i figur 1.1. I 2012 ble 12 av de 16 tilfellene påvist i settefiskanlegg [69].

Sykdommen smitter direkte mellom individer via feces og vann eller indirekte via gjenstander [102, 134, 133]. Bakterien er i stand til å overleve og forbli infeksjons i et akvatisk miljø [133]. Den er også i stand til å danne biofilm på solide materialer [24].



Figur 1.1: Antall påviste tilfeller av Yersiniose i Norge de siste årene. Tall hentet fra Fiskehelse rapporten 2012 [69].

Utbrudd med Yersiniose er ofte forbundet med stress, og kan forårsakes av blant annet håndtering, transport, vannmangel, lavt oksygenivå og høye temperaturer [102, 66]. Yersiniose kan angripe fisk i alle livsstadier. Sykdommen er som oftest mest akutt hos fisk opp til yngelstørrelse, mens den ser ut til å følge et mer kronisk forløp hos større fisk. Angrepet fisk kjennetegnes på apatisk atferd og tap av appetitt, noe som igjen reflekteres i en tom tarm. Det kan observeres blødninger i hud, på gjeller og finner. Blødninger i og rundt munnhulen har gjort at sykdommen har blitt kalt rødmunnsyken. Utstående øyne og væske i bukhulen er vanlig. Innvendig kan en finne punktblødninger på overflaten av lever, bukspyttkjertel (pancreas), blindsekker, svømmeblære og bukhinne. Milten er ofte forstørret og kan være nærmest svart (milten er normalt mørk rødbrun) [102, 134, 64, 8].

1.2 Vaksinasjon som Forebyggende Tiltak mot Sykdom

Vaksinasjon er et av de viktigste forebyggende tiltakene for å hindre utrudd av smittsomme sykdommer i Norsk og internasjonal lakseoppdrett [79]. Uten vaksiner, spesielt mot bakterielle agens, ville både sykdomsforekomsten og antibiotikaforbruken vært større, noe som ville gått ut over økonomien i oppdrett [15]. Moderne industrielt fiskeoppdrett, slik det drives på laks og regnbueørret i Norge, ville ikke vært mulig uten vaksinasjon. Dels ville økt forekomst av sykdom skapt uakseptabel dyrevelferd og dels ville behandling med antibiotika hatt uakseptable miljøpåvirkninger. Summen av disse faktorene ville ødelagt økonomien i oppdrett [15]. Innføringen av vaksiner til laks og ørret har vært med på redusere antibiotikaforbruken i oppdrett [79].

Dersom man ser på forbruket av antibakterielle midler i forhold til mengden fisk produsert, ser man at i 1987 var forbruket av antibakterielle midler (antibiotika) i oppdrettsfisk nesten 50 tonn rent legemiddel, samtidig som fiskeproduksjonen var ca. 50 000 tonn. I 1997 var forbruket av antibakterielle midler redusert til 746 kg mens fiskeproduksjonen hadde økt til 316 000 tonn [79]. I 2012 var totalsalget av antibakterielle midler til terapeutisk bruk i oppdrettsfisk på 1 591 kg ren substans [107] mens det ble høstet 1 326 308 tonn fisk og skalldyr, hvorav 2 004 tonn var skalldyr (foreløpige tall) [153]. Bruken av antibakterielle midler har siden 1987 blitt redusert med 97%. Effektive vaksiner er en av hovedårsakene til denne nedgangen i antibiotika-bruk, samtidig med andre infeksjonsforebyggende tiltak (som bedre miljøforhold, generasjons-skille, brakkleggingperiode osv) [107].

Ved vaksiner vil fiskens immunforsvar utsettes for antigener fra den sykdomsfremkallende mikroorganismen man vil vaksinere mot. Når antigenpresenterende celler støter på antigenet, vil antigenet tas opp, brytes ned og en liten del av antigenet vil bli vist frem på overflaten av den antigenpresenterende cellen. Naive T-celler vil gjenkjenne antigenet som fremmed og ak-

tiveres. Hjelper T-celler vil varsle andre immunceller som setter i gang immunresponen. Naive B-celler gjenkjenner antigener vist fram av antigenpresenterende celler og antigener i fri form. B-cellene prolifererer til flere aktive B-celler som er spesifikk for antigenet. Noen av disse vil bli plasma B-celler mens andre blir hukommelses B-celler. Plasma B-cellene produserer spesifikke antistoffer. Hukommelses B-cellene vil ved en sekundær infeksjon aktivere plasma B-celler som skiller ut antistoffer raskere og mer effektivt enn ved vaksineringsen [158].

Mange antigener vil gi for dårlig immunrespons hos vertedyret dersom det gis alene, og det kan derfor være nødvendig å tilsette adjuvans til vaksinerne [79]. Adjuvantia er hjelpestoffer (oljer, aluminiumssalter, saponiner, glukaner) som tilsettes for at immunsystemet skal bli ekstra trigget av komponentene fra mikroorganismen [136, 15, 79]. Adjuvantia virker også lokallirriterende og gir en kraftigere betennelsesreaksjon på infeksjonsstedet [79].

1.2.1 Vaksintyper

Det finnes flere typer vaksiner; sub-unit vaksiner [136, 76, 15], attenuerte vaksiner [136], DNA vaksiner [73, 83] og inaktiverede vaksiner [136, 15].

I dette forsøket ble det brukt en inaktivert vaksine. Inaktiverede vaksiner består av bakterier eller virus som er inaktivert av enten formalin eller β -propiolactone, slik at den fortsatt er i stand til å inducere en immunrespons uten å være skadelig [136]. Mikroorganismen dyrkes først opp i medium før den inaktiveres [15].

1.2.2 Vaksinasjonsmetoder

Vaksinasjon av fisk kan i prinsippet skje ved tre forskjellige metoder; injeksjonsvaksinering (intraperitonealt eller intramuskulært), immersjonsvaksinering (dypp eller bad) eller oral vaksinering [63].

Injeksjonsvaksinering

Ved bruk av denne metoden injiseres en liten dose av vaksinen direkte i fisken, enten intraperitonealt eller intramuskulært [96, 63]. Dette kan gjøres manuelt eller automatisk [79]. Injeksjon av agens i en god formulering gir som regel den beste beskyttelsen [96]. Ulempene med injeksjonsvaksinering er at metoden er arbeidskrevende og at fisken håndteres relativt mye under prosessen [79, 63]. Det er heller ikke praktisk å injisere fisk når den er under 20 gram [63]. I Danmark er nye metoder for å injeksjonsvaksinere små fisk under testing [22].

Injeksjonsvaksiner er ofte multivalente vaksiner som enten inneholder ulike bakteriner eller en kobinasjon av bakteriner og drepte virus eller virale proteiner [20]. En annen fordel med injeksjonsvaksiner er at man kan forsterke immunresponen ved å tilsette adjuvantia [95, 7].

Immersjonsvaksinering

Ved immersjonsvaksinering eksponeres fiskens overflate for vaksinen [40]. Vaksinen tas hovedsaklig over gjellene [40]. Det finnes hovedsaklig to metoder å gjøre dette på; dyppvaksinering eller badevaksinering. Begge metodene krever liten eller ingen håndtering av fisken, og fører derfor til liten belastning på fisken. I tillegg er metodene lite arbeidskrevende [79]. Ved dyppvaksinering dyppes en liten mengde fisk i vaksine som er fortennet (vanligvis 1:10 fortykning). Fisken holdes vanligvis bare en kort tid i vaksinen (30-60 sekunder) [19]. Ved badevaksinering helles en fortykning av vaksinen (1:500) direkte i fisketanken [40, 19]. Fisken eksponeres for for vaksinen i en lengre tid (omtrent 30 minutter) [19]. Vanntilførselen stoppes, oksygen tilføres og vannstanden senkes under selve vaksineringen [117]. Ulempen med disse to metodene er at vaksineforbruket er stort [40, 79]. Beskyttelsen som oppnås ved immersjonsvaksinering er kortvarig, og revaksinering kan derfor være nødvendig [79].

Oral Vaksinering

Denne vaksinasjonsmetoden innebærer at vaksinen blandes inn i foret som gis til fisken. Fordelene med denne metoden er at den er anvendelig for alle størrelser, og at det er lett å vaksinere store mengder fisk på en gang. Metoden krever lite arbeid og er lite stressende for fisken. Ulempene er at det kreves store mengder vaksine, samtidig som det er vanskelig å sikre at alle fiskene får i seg vaksinen i tiltenkt dose. I tillegg er beskyttelsen generelt dårlig og kortvarig [40].

1.3 Immunforsvaret

Immunforsvaret består av spesialiserte celler, vev og molekyler som er med på å beskytte verten mot infeksjoner og som er med på å utrydde etablerte infeksjoner [1, 118]. Immunforsvaret kan deles inn i to; det medfødte (uspesifikke) immunforsvaret som gjenkjenner patogener generelt og hindrer at de sprer seg, og det adaptive (spesifikke) immunforsvaret som gjenkjenner patogener spesifikt ved hjelp av overflateantigener og eliminerer infeksjonen ved å produsere spesifikke antistoffer og cytotoxiske lymfocytter [162]. Det medfødte immunforsvaret settes i gang før det adaptive immunforsvaret [161], og er med på aktiveringen av de spesifikke immunreaksjonene [82]. I det medfødte immunforsvaret inngår stimulering av fagocytter, produksjon av cytokiner og kjemokiner, og aktivering av komplementsystemet og andre celle-reseptorer. Alle disse er med på stimulering av B-celler, T-celler og antigen-presenterende celler i det adaptive spesifikke immunforsvaret [82].

1.3.1 Det Medfødte Immunforsvaret

Det medfødte immunforsvaret inkluderer fysiske barrierer som skjell, slimhinner og epidermis, cellulære faktorer som fagocytterne celler, uspesifikke cytotoxiske celler og dendrittiske celler, og humorale faktorer som er løselige faktorer som gir en beskyttende funksjon ved å hemme veksten til mikroorganismer eller ved å nøytralisere enzymer den patogene organismen er avhengig av [161, 85].

Det medfødte forsvaret er spesialisert på å oppdage fremmede celler ved hjelp av reseptorer som gjenkjenner molekylære mønstre som er forskjellig fra vertens egne molekylære mønstre. Disse molekylene går under samlebetegnelsen "pathogen associated molecular patterns" (PAMPs), og inkluderer polysakkarider, lipopolysakkarider, peptidoglykaner, bakterielt DNA, viralt RNA og andre molekyler som typisk ikke finnes på overflaten til multicellulære organismer [161, 92].

Fysiske Barrierer

Skjell, slimhinner på hud og gjeller, og epidermis virker som en førstebarriere mot infeksjoner [41, 108]. Slim fanger opp patogener effektivt, og inneholder flere anti-bakterielle peptider (lysozymer, lektiner og peptider) som hindrer patogener fra å trenge inn i organismen [108].

Medfødte Cellulære Faktorer

Som nevnt over inkluderer de cellulære faktorene fagocytiske celler, ikke-spesifikke cytotoxiske celler og dendrittiske celler.

De fagocytterende cellene inkluderer granulocytter (neutrofiler), monocytter/makrofager, eosinofiler, basofiler og mastceller [55, 106, 132]. B-lymfocytter har også vist seg å være fagocytterende i fisk [78]. Monocytter/makrofager og neutrofile granulocytter er hovedcellene som er involvert i fagocytose hos fisk [145, 143]. Monocytter finnes i nyren, og regnes for å være forløperen til makrofager. De er i stand til å migrere ut i blodet til inflammasjonssteder, der de differensierer til makrofager. Makrofager finnes hovedsaklig i nyre og milt, men er også spredt i andre vev, inkludert gjeller og kroppshulen [132]. Neutrofile granulocytter finnes i nyre, milt og blod i betente vevsskader (inflammatoriske lesjoner) [3].

Fagocytose er en av de viktigste prosessene hos vekselvarme dyr, da det er en prosess som i liten grad påvirkes av temperaturen [161]. Denne prosessen innebærer at mikroben eller andre substanser binder til overflaten av den fagocytterende cellen, mikroben tas opp i et fagosom for enzymatisk nedbrytning, før produktene eventuelt skilles ut [118]. Opsoniner (komplementfaktorer eller antistoffer) og cytokiner kan forsterke den fagocytiske aktiviteten ved å øke opptaket av partikler eller ved å aktivere fagocytene [132, 118]. CRP og lektiner kan ha en opsoniserende effekt i fisk [132].

Uspesifikke cytotoksiske celler lik naturlige dreperceller hos pattedyr, og har som oppgave å drepe infiserte celler [52].

Antigenpresenterende celler er celler som fanger opp antigener og viser dem frem for lymfocytter (B- og T-celler) [1]. I fisk er det vist at antigenpresentering er mediert av makrofager [87, 145]. Makrofager kan aktiveres av både cytokiner og opptak av døde celler [128].

Medfødte Humorale Faktorer

I kroppsvæsker, inkludert sekrrert slim, finnes det en rekke løselige faktorer som gir en beskyttende effekt ved å hemme veksten til mikroorganismer eller ved å nøytralisere enzymer den intregende organismen er avhengig av [132]. De humorale faktorene klassifiseres gjerne basert på deres mønstergjenkjenningsspesifisitet eller effektorfunksjoner [85], og inkluderer veksthemmere som transferrin [41] og interferon (IFN) [41, 131, 33], ulike proteaseinhibitorer [86], lysozymer [85, 161], lektiner som C-type lektiner og pentraxiner [85, 172], komplementsystemet [161], naturlige antistoffer og cytokiner.

Naturlige antistoffer, hovedsaklig IgM, produseres i størst grad av B1 celler i fravær av stimulering av spesifikke antigener [16]. Disse naturlige antistoffene finnes i høye nivåer i serum hos fisk hvor de gir en umiddelbar og bred beskyttelse mot bakterier og virus, noe som gjør disse cellene til viktige komponenter av det medfødte immunforsvaret [172]. Naturlige antistoffer er en del av førstelinjeforsvaret og kan påvirke graden av antistoffrespons for ytterligere immunisering med samme antigen [148].

Cytokiner er signalmolekyler som skilles ut av leukocytter for å koordinere immunresponser [132], ved å regulere vekst, differensiering og aktivering av andre immunceller [163]. Denne utskillelsen er viktig for en rask og effektiv immunrespons [162]. Cytokinene kan deles inn i interferoner (IFN), interleukiner (IL), tumor nekrose faktor (TNF), kolonistimulerende faktorer og kjemokiner [139]. Kjemokinene og noen proinflammatoriske cytokiner, som som IL-1 β , TNF- α og IL-6 virker ved å tiltrekke fagocytter til inflammsjonsstedet [132, 146, 101]. IL-1 β er et av cytokinene som blir tidligst uttrykt under en infeksjon, og lar organismen reagere umiddelbart på infeksjoner ved å sette i gang en kaskade av reaksjoner som fører til inflammasjon [37]. IL-1 β har blitt påvist hos 13 teleoster, og er involvert i reguleringen av immunitet gjennom stimuleringen av T-celler. Funksjonen til IL-1 β hos disse artene er analog til den hos IL-1 β hos pattedyr [88, 86]. Hos pattedyr produseres IL-1 β hovedsaklig av monocytter i blod og makrofager i vevet [129]. Reseptorer for IL-1 familien har blitt klonet og sekvensert fra regnbueørret og Atlantisk laks. Disse reseptorene ser ut til å være uttrykt i flere vev og er regulert i hodenyre, milt, lever og gjeller etter stimulering med LPS og TNF- α . Dette indikerer at IL-1 spiller en rolle i reguleringen av IL-1 β under betennelsesresponser [138, 155]. TNF- α spiller en viktig rolle i flere ulike vertsresponser,

inkludert celleproliferasjon, differensiering, nekrose, apoptose og induksjon av andre cytokiner [121]. IFN- γ og IL-17/IL-22 frigis under spesifikke immunresponser og virker ved å aktivere fagocytter og forsterker uspesifikke forsvarsmekanismer [132]. IL-17 er et proinflammatorisk cytokin som skilles ut av aktiverte T-celler [99]. Gener for IL-17 familien uttrykkes spesielt i gjeller og hodenyre [72]. TNF- α og - β aktiverer makrofager. Dette er vist for regnbueørret, piggvar (turbot), sea bream (*Sparus aurata*), gullfisk (*Carassius auratus*) og malle [175, 100, 157].

1.3.2 Det Adaptive Immunforsvaret

Det adaptive immunforsvaret gjenkjenner spesifikke patogener og setter i gang en sterkere og mer effektiv respons ved en sekundær infeksjon [162].

Hovedcellene i de spesifikke immunmekanismene er B- og T-lymfocytene, samt deres produkter (antistoffer) [132, 1]. Disse cellene er ansvarlig for spesifikk gjenkjennelse av patogener og initiering av den adaptive immunresponsen (humorale immunresponser, celledmedierte immunresponser og immunologisk hukommelse) [86, 132]. Cellene uttrykker reseptorer som gjenkjenner substanser av mikroben, antigener [1]. T-cellene har antigenreseptorer i membranen, som virker via direkte kontakt med andre celler (direct cell-to-cell contact), mens B-cellene skiller ut løselige antigenreseptorer som sendes ut til hele kroppen [141]. Det har blitt vist at fisk har tydelige populasjoner av B- og T-celler [149].

Lymfocytter er tilstede i sirkulerende blod og lymfe, og er funnet i de lymfoide organene hos fisk: thymus, nyre og milt [132]. I tillegg er det kommet beviser som indikerer at hud, gjeller og tarm burde regnes som immunreaktive vev, ettersom det under enkelte patologiske eller fysiologiske forhold vil være et større antall lymfocytter til stede og et større antall av antistoffproduserende celler kan bli funnet [27, 28, 29, 179].

Et viktig aspekt ved den spesifikke immuniteten er hukommelse, som utgjør en adaptiv forandring i de lymfoide cellepopulasjonene, slik at ved en senere eksponering vil en sekundær immunrespons skje. Denne sekundære immunresponsen er karakterisert av en kortere latent periode og større omfang [132].

Spesifikk Celledmediert Immunitet

Den celledmedierte immuniteten medieres av T-celler (T-lymfocytter) [132, 1]. T-cellene produserer faktorer som enten koordinerer responsene hos andre immunceller eller cytotoksiske faktorer som direkte dreper infiserte eller abnormale celler [74]. Funksjonene til T-celler hos fisk er stort sett ukjent, hovedsaklig på grunn av manglende populasjoner av spesifikke klonale antistoffer (mAbs). I senere tid har det kommet beviser som tyder på aktivitet til cytotoksiske T-celler [104, 52]. T-cellene kan deles inn i hjelper T-celler

(CD4⁺) og cytotoksiske T-celler (CD8⁺).

Hjelper T-celler er cytokinproduserende celler som gjenkjenner mikrobielle antigener forbundet med klasse II MHC-molekyler på antigenpresenterende celler [74, 1]. Disse cellene uttrykker overflatemolekyler på celler som binder til reseptorer på B-celler og makrofager. Binding til B-celler fører til produksjon av antistoffer mens binding til makrofager stimulerer makrofagen til å eliminere mikroben [1]. CD4⁺ hjelper T-celler kan differensieres til underklasser av effektorceller som produserer bestemte sett av cytokiner og utfører ulike effekter. Utviklingen av disse ulike cellene reguleres av stimuli som de native CD4⁺ T-cellene mottar når de støter på mikrobielle antigener [1, 74]. Blant underklassene av hjelper T-celler finner man blant annet T_H1, T_H2, T_H17, og Tregs (regulatoriske T-celler) [74].

T_H1-celler sekreterer cytokiner som IFN- γ og TNF- α og IL-2. TNF α virker på leukocytter og makrofager i hodenyren, og induserer et økt uttrykk av proinflammatoriske molekyler [181]. TNF α aktiverer også makrofager [161].

Cytokinet IFN γ har blitt påvist hos fisk, men til forskjell fra hos høyere vertebrater har fisk to former av dette cytokinet (IFN- γ 1 og IFN γ 2). Dette cytokinet kontrollerer intracellulære infeksjoner [130]. IL-2 induserer proliferasjon av T-celler [36].

T_H2-celler produserer IL-4, IL-5 og IL-13 som stimulerer B-celler og kontrollerer ekstracellulære infeksjoner [74].

T_H17-celler produserer hovedsaklig IL-17. De kan også produsere IL-21 og IL-22 [169]. IL-17 ser ut til å kontrollere ekstracellulære bakterielle infeksjoner, men deres nøyaktige funksjon er fortsatt uklar [60]. T_H22-celler skiller ut IL-22 som er involvert i reparasjon av epidermis [46].

Noen hjelper T-celler fungerer ved å hindre eller begrense immunresponsen, og kalles regulatoriske T-celler [1]. Regulatoriske T-celler finnes i flere former, medfødte Treg eller ervervet Treg. Medfødte demper inflammasjon ved celle-til-celle kontakt, mens de ervervete skiller ut TGF- β og IL-10 som reduserer inflammasjon [71].

Cytotoksiske T-celler (CD8⁺) gjenkjenner peptider som stammer fra cytoplasmiske mikrober (intracellulære mikrober), og som er forbundet med klasse I MHC-molekyler på antigenpresenterende celler [1]. Cytotoksiske T-celler har evnen til å drepe infiserte eller abnormale celler direkte. Dette gjøre de ved å frigi cytotoksiske proteiner, som granzymmer og perforin, fra cellulære granula [180].

Noen av T-cellene som dannes utvikles til hukommelses T-celler. Disse cellene vedvarer etter en infeksjon og sirkulerer rundt i en inaktiv form, klar til å ekspandere ved en sekundær infeksjon [1, 124].

Spesifikk Humoral Immunitet

Spesifikke humorale immunresponser innebærer produksjon av antistoffer som enten uttrykkes som reseptorer på B-celler eller som skilles ut i plas-

ma [132, 173, 124]. B-cellene er de eneste cellene som produserer antistoffer [179].

Antistoffer er en klasse av proteiner kalt immunglobuliner (Ig). Den beskyttende rollen til antistoffer inkluderer nøytralisering av virus, toksiner og bakterielle adhesiner, aktivering av komplementsystemet og opsonisering av partikler (bakterier og virus) [132, 53, 81]. Hos teleoster finnes det tre klasser immunglobuliner; IgM, IgD og IgT [61]. Immunglobulinene er tilstede i blod, og i mukussekresjoner fra hud og tarm, og i galle [137].

Når antistoffene uttrykkes som reseptorer, gjenkjenner de antigener og initierer prosessen som aktiverer B-cellen [1, 132]. Når B-cellene tar opp antigener, bryter de dem ned, og viser frem peptider bundet til MHC-molekyler for gjenkjennelse av hjelper T-celler. Hjelper T-celler uttrykker cytokiner og overflateproteiner som sammen virker til å aktivere B-cellen. Ved aktivering prolifererer og deretter differensierer B-cellene til hukommelsesceller eller plasmaceller [1, 86]. Plasmacellene skiller ut ulike klasser antistoffer med bestemte funksjoner [1].

Lymfoide Organer

Cellene som utgjør immunsystemet, er lokalisert i bestemte organer og vev, og sirkulerer via blod- og lymfeårer mellom organene. Til forskjell fra pattedyr mangler fisk lymfeknuter og beinmarg, men har lymfoide organer [118]. De største lymfoide organene funnet i fisk inkluderer thymus, milten og nyren (hodenyre og midtnyre) [161].

Thymus er et paret intraepitelt organ som er lokalisert i øvre del av gjellehulen og som hovedsaklig består av lymfoid vev [118]. I utgangspunktet kan thymus betraktes som en samling av makrofager som fremmer den innkapslede proliferasjonen av T-celler [31]. Thymus er ansvarlig for produksjonen av T-celler [161]. Umodne T-celler migrerer til thymus der de differensieres til immunkompetente T-lymfocytter [118].

Hodenyren inneholder hovedsaklig lymfoide og hematopoetiske celler, mens den midtre og bakre delen av nyren hovedsaklig inneholder ekskretoriske komponenter (men også lymfoide og hematopoetiske celler) [118]. Hodenyren er et viktig hematopoetisk organ [47] og har likheter med beinmargen hos høyere vertebrater [93]. Hovedcellene som finnes i hodenyren er makrofager som aggregerer til strukturer kalt melanomakrofagsentre, og lymfoide celler som er funnet ved alle utviklingsstadier hos fisken og som hovedsaklig finnes som B-celler (Ig+ celler) [116]. I hodenyren finner man også et omfattende system av sinusoider som er støttet opp av endotelceller (som kler sinusoidene), adventitial celler (som dekker abluminaloverflaten til endotelcellene) og retikulære celler som har fagocytisk aktivitet [93]. Makrofager og endotelceller i sinusoider bidrar til å fange opp partikler fra blodet [84, 26, 18, 118]. Det produseres antistoffer i hodenyren, og melanomakrofagsentrene er i stand til å holde antigener tilbake for en lengre periode etter administrering el-

ler vaksinerings [75, 62, 160, 18], noe som kan spille en rolle i immunologisk hukommelse [120].

Milten består av et system gjort opp av ellipsoider, melanomakrofagsentre og lymfoid vev. I de fleste fiskeartene er ellipsoidene samlet rundt de andre to komponentene [49]. Milten kan deles inn i rød og hvit pulpa. Rød pulpa utgjør størstedelen av milten [59, 144, 118] og består av et nettverk av retikulære celler som støtter opp sinusoider. Sinusoidene inneholder ulike immunceller, blant annet makrofager og lymfocytter. Den hvite pulpa inneholder to komponenter: melanomakrofagsentre og ellipsoider [118, 4, 62, 43]. Ellipsoidene er tykkveggede kappilærer [161] med spesialiserte vevsmakrofager som har som oppgave å fagocyttere blod-bårne substanser som antigener og immunkomplekser (antigen-antistoff-komplekser) [118, 161, 39, 144, 45]. Veggene i ellipsoidene består av tettpakket retikulinfibre, der makrofager finnes blant fibre og er aktive i opptaket av fremmede partikler, som karbonpartikler og bakterier [132, 178, 44]. Ved antigenstimulering vil antistoffproduserende celler, lik de man finner i nyren, dukke opp. Retikulinfibre i ellipsoidene er viktige for å fange opp immunkomplekser, som holdes tilbake av melanomakrofagsentrene for en lengre periode [132, 42, 50, 4]. Prosessen med antigenfangning og prosessen der antigener holdes tilbake har en viktig rolle i immunologisk hukommelse [132, 161]. Evnen melanomakrofager har til å holde igjen antigener for en lengre periode har likheter med germinale sentre hos høyere vertebrater [42, 50, 4]. Hos fugl og pattedyr er germinale sentre tilstede i milt og lymfeknuter. Dendrittiske celler i de germinale sentrene fanger immunkomplekser via komplementreseptorer på overflaten. B-hukommelsesceller, spesifikk for det fangede antigenet, er tilstede i og hjemme på de germinale sentrene. Disse strukturene er regnet for å være involvert i gjennomføringen av og/eller etableringen av immunhukommelse. Fisk og andre vekselvarme dyr mangler germinale sentre, men de er i stand til anamnestic (immunologisk hukommelse) respons, og det har blitt foreslått at melanomakrofagsentre kan representere en primitiv analoger til de høyere vertebraters germinale sentre [119, 5].

1.4 Stress

Fisk i oppdrettsanlegg går i løpet av livet gjennom flere prosesser som kan virke forstyrrende og dermed stressende på fisken. Dette kan være håndtering, transport, vaksinerings, predatorer osv. Effekten av slike forstyrrelser er en endring i de biologiske forholdene utover den normale hviletilstanden som forstyrrer homeostasen. Som en respons på slike stressorer skjer det en rekke adaptive mekanismer i fisken som forsøker å få systemet i balanse igjen/opprettholde homeostasen. Stress kan dermed defineres som en tilstand der homeostasen gjenopprettes gjennom en serie av adaptive responser [23]. Disse responsene kan være en endring i oppførsel eller de kan være fy-

siologiske responser, som endringer i fysiologiske funksjoner, hormoner eller cellulære mekanismer, som er med på å gjenopprette homestasen [2, 170, 9].

1.4.1 Akutt og Kronisk Stress

Man skiller gjerne mellom akutt og kronisk stress. Akutt stress defineres som stress som varer fra minutter til timer, mens kronisk stress er stress som varer i flere timer per dag over uker eller måneder [35]. Det er viktig å understreke at forskjellen mellom akutte og kroniske stressorer overlapper, og det er vanskelig å generalisere effektene ulike stressorer har på ulike dyr [142].

Fisk har en naturlig kapasitet til å respondere på stress og dermed opprettholde homeostasen. Disse responsene er adaptive og er ikke skadelige for fisken. Dersom disse responsene tvinges utenfor de normale grensene, vil responsene være maladaptive og skadelig for fisken. For eksempel vil kortisol som skiller ut under akutt stress være med på å opprettholde homeostasen gjennom stimulering av glukoneogenesen og gjennom involvering i osmoregulering. Under langvarig, kronisk, stress kan kontinuerlig utskillelse av kortisol gi skadelige, maladaptive effekter [112].

1.4.2 Klassifisering av Stressresponser

Stressresponser kan deles inn i primære, sekundære og tertiære stressresponser [165, 168, 166], og er illustrert i figur 1.3.

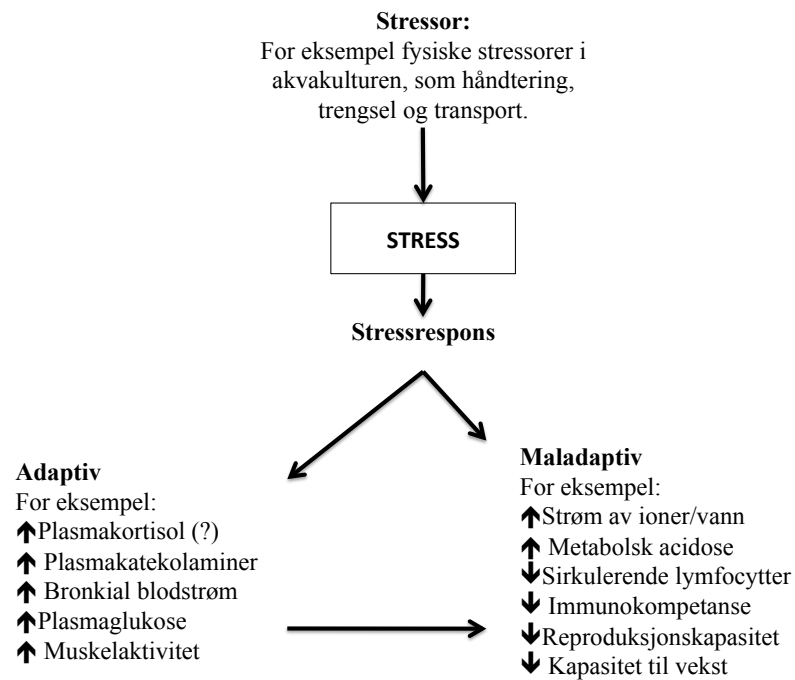
Den primære stressresponsen involverer frigjøring av katekolaminer, adrenalin og noradrenalin, fra kromaffint vev [123, 125], og stimulering av HPI-aksen (hypotalamus-hypofyse-interrenalt vev) til å frigjøre kortikosteroidhormoner, blant annet kortisol, ut i blodbanen [38, 170, 97]. De sekundære stressresponsene skjer som et resultat av de primære endokrine responsene [91], inkluderer metabolske, hematologiske, hydromineralske og strukturelle forandringer [14, 165, 58]. Ved langvarig stress kan det oppstå tærtire stressresponser, som påvirker hele dyret (individet eller populasjonen) [167, 166]. Disse stressresponsene påvirker blant annet vekst, metabolisme, sykdomsmotstand, reproduksjon og svømmeevne [14, 165, 58, 166].

1.4.3 Den Endokrine Stressresponsen

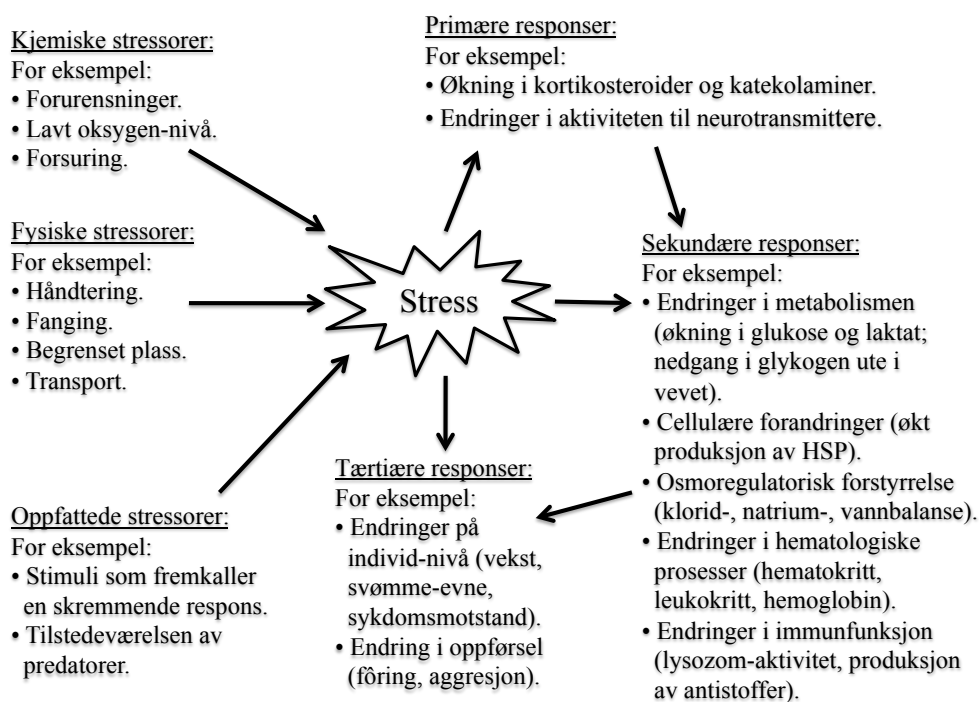
Stress fører til to typer endokrine responser; den adrenerge responsen som fører til økt plasmakonsentrasjon av adrenalin og noradrenalin, og HPI-responsen som resulterer i økt plasmakonsentrasjon av kortisol [156].

Den Adrenerge Stressresponsen

Stress etterfølges av en øyeblikkelig, rask økning i plasmakonsentrasjonen av katekolaminer, hovedsaklig adrenalin og noradrenalin [156, 91, 123, 125].



Figur 1.2: En enkel representasjon gjengitt fra Barton 2002 [9] av forholdet mellom stressor, stress og de adaptive og maladaptive stressresponsene i fisk. Selv om en økning i plasmakortisol kan ses på som en adaptiv respons på grunn av de mulige glukoneogeniske effektene, har ikke denne rollen til kortisol under stressende forhold for fisk blitt entydig bekreftet.



Figur 1.3: Faktorer som påvirker stress, og resultatet av disse. Hentet fra Barton 2002 [9].

Katekolaminer skilles ut fra kromaffine celler, som hovedsaklig er lokalisert i fremre del av nyren [127, 125]. Sekrerte katekolaminer synes å påvirke kardiovaskulære og respiratoriske funksjoner, og virker ved å mobilisere energilagre. Målet med disse responsene er å rette på de forstyrrende effektene stress har på normalfysiologi [123]. Selv om katekolaminer frigjøres fra lagrene under stress, fører ikke dette en nedgang i mengden katekolaminer, noe som tyder på at disse hormonene produseres hele tiden. Det er da tilstrekkelige mengder av katekolaminer tilgjengelig dersom en ytterligere belastning forekommer [126]. Sirkulerende katekolaminer har kort biologisk halveringstid, og det er derfor lite brukt som indikator på primære stressresponser [170, 171].

HPI-Stressresponsen

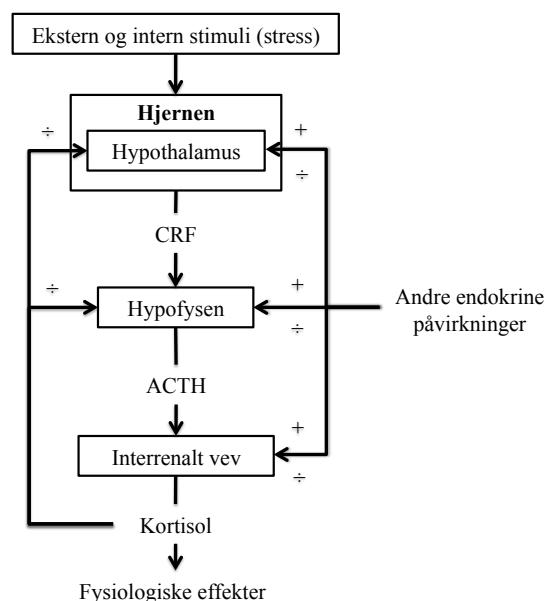
Aktivering av HPI-aksen fører til at kortisol produseres og skilles ut fra fremre del av nyren [156]. Kaskaden av hormoner i HPI-aksen som fører til denne utskillelsen er illustrert i figur 1.4, og begynner med frigjøringen av kortikotropinfrigjørende hormon (CRH) eller kortikotropinfrigjørende faktor (CRF) fra hypothalamus i hjernen. CRH/CRF stimulerer kortikotrofe celler i den fremre delen av hypofysen til å skille ut adrenokortikotropin (ACTH) ut i blodstrømmen. Sirkulerende ACTH stimulerer videre interrenale celler i fremre del av nyren til å produsere og skille ut kortisol ut i blodstrømmen. Effektene av kortisol inkluderer endringer i elektrolyttbalansen, endringer i metabolismen og endringer i immunforsvaret [112]. Aktiviteten til HPI-aksen er regulert gjennom negative tilbakekoblingsmekanismer [54, 38, 17, 170].

1.4.4 Kortisol som Indikator på Stress

Syntesen og frigjøringen av kortisol er forsinket på flere minutter i forhold til frigjøringen av katekolaminene adrenalin og noradrenalin [165, 57]. Generelt vil kortisolnivået reflektere varigheten og alvorlighetsgraden på stresset. [114, 13] På grunn av dette er det sirkulerende nivået av kortisol brukt som et mål på graden av stress [12, 170]. Hvilenivået av sirkulerende kortisol ligger generelt under 82,8 – 110,4 nmol/L (40 – 200 ng/ml) [114]. Dette nivået kan påvirkes av naturlige svingninger i kortisol-nivået [113]. For eksempel kan nivået av kortisol tidobles under smoltifisering hos anadrome salmonider [10, 176]. Vanligvis ligger toppen av sirkulerende kortisol mellom 110,4 – 552 nmol/L (40 – 200 ng/ml) [114], men høyere nivåer er ikke unormalt [11, 89, 32, 77].

1.4.5 Effekter av Stress på Immunforsvaret

Stress øker mottakeligheten for sykdom [111, 164, 152]. Men stress kan ha både en positiv eller en negativ effekt på immunfunksjonene [90, 48], og dette



Figur 1.4: HPI-aksen med tilbakekoblingsmekanismer. Modifisert fra Pickering 1989 [112].

vil avhenge av intensiteten og varigheten til stressoren [35, 34]. Som nevnt over kan langvarig, kronisk stress føre til skadelige effekter, og gjøre fisken mer mottakelig for sykdom [112].

Hos rotter er det blitt vist at akutt stress førte til en betydelig økning i antigenspesifikke, cellemedierte immunresponser i huden. Grunnen til dette kan være redistribusjon av leukocytter til huden. Kronisk stress hemmet denne responsen [35]. Hos fisk er dette også observert, der man kan se en endring i distribusjonen av leukocytter og en endring i antall sirkulerende leukocytter under stress [115]. Antallet lymfocytter og monocytter går ned mens antallet neutrofiler går opp. Akutt stresset fisk har høyere antall aktive makrofager i huden, økt aktivering av T-celler og høyere antall T-celler i huden [34, 174].

Det har blitt vist at kortisol hemmer LPS-indusert uttrykk av pro-inflammatoriske cytokiner som IL-1 β , TNF- α og IL-12 [135, 48, 154]. Det har også blitt vist at kortisol hemmer apoptose og proliferasjon av immunceller, noe som er nødvendig for effektiv aktivering og inaktivering av immunresponser. Dett har blitt vist for blant annet makrofager og monocytter i regnbueørret [109] og for makrofager i Atlantisk laks [48].

Stress reduserer antallet sirkulerende B-celler, og senker antistoffproduksjonen etter immunisering *in vivo* [162].

Tabell 1.1: De ulike stadiene av anestesi hos fisk. Hentet fra Coyle et al. 2004 [25].

Stadie	Tilstand	Oppførsel/Respons
I	Sedasjon	Bevegelse og respirasjon redusert.
II	Anestesi	Delvis tap av likevekt. Reagerer på berøring.
III	Kirurgisk anestesi	Fullstendig tap av likevekt. Reagerer ikke på berøring.
IV	Død	Respirasjon og hjerteslag stopper. Overdose - eventuell død.

1.5 Anestesi

Anestesi (fra gresk: an- 'uten' og aisthesis 'følelse') består av flere komponenter, inkludert sedasjon, immobilisering, narkose, amnesia (tap av hukommelse) og analgesi (smertelindring) [177]. Sedasjon er nedsatt følsomhet, noe som resulterer i nedsatt bevegelse og redusert respirasjon [25, 177]. Narkose (generell anestesi) forårsaker en tilstand med bevisstløshet og hukommelsestap, og inkluderer immobilisering og smertelindring. De ulike komponentene av anestesi kan oppnås ved å bruke ulike anestetiske midler [177].

De fleste anestetiske midler gir flere nivåer av anestesi. Disse stadiene inkluderer sedasjon, anestesi, kirurgisk anestesi og død (tabell 1.1).

Den vanligste måten å administrere et anestetisk middel er ved immersjon [105]. Det anestetiske middelet løses da ut i vann i anbefalt konsentrasjon. Når fisken dyppes i anestesibadet vil middelet tas opp via gjellene og huden. Vannkvaliteten i anestesibadet og oppvåkningstanken burde være mest mulig lik vannkvaliteten i tanken fisken kom fra [25, 51, 177].

Mange faktorer påvirker effektiviteten til det anestetiske middelet, blant annet kroppsstørrelse, helsetilstand og fettløselighet til det anestetiske middelet. Jo større gjelleareal i forhold til kroppsvekten, jo mer effektivt vil det anestetiske middelet være, og større individer krever ofte større konsentrasjoner enn mindre individer. Syke og svake individer er ofte mer mottakelig for anestesi. Enkelte anestetiske midler, som MS-222, er fettløselig og tas opp mye lettere over gjellene og huden [25].

I dette forsøket ble to ulike bedøvelser benyttet, AQUI-S™ og Metomidat.

1.5.1 AQUI-S™

AQUI-S™ er et reaktivt nytt anestetikum for fisk, utviklet av Seafood Research Laboratory i New Zealand, som fikk markedsføringstillatelse i Norge 14.mai 2013. Dette middelet består av omtrent 50% (540g l⁻¹) isoeugenol (2-methoxy-4-propenylphenol) (aktivt stoff) og 50% polysorbat 80 (emulgator) [25, 68]. Middelet har vist å ha en stresshemmende effekt [68, 25], og er derfor gunstig å bruke under prosesser som kan være stressende for fisken.

I følge pakningsvedlegg fra ScanAqua vil en konsentrasjon på 3.7 – 9.3 ml Aqui-S /1000liter vann gi sedasjon. Dette tilsvarer 2 – 5 mg isoeugenol/liter vann.

1.5.2 Metomidat

Metomidat (DL-1-(phenylethyl)-5-(methoxycarbonyl)imidazde hydrochloride) er klassifisert som et hypnotikum uten smertedependende effekt [65]. Metomidat stimulerer og aktiverer GABA_A (gamma-aminobu-tyric acid type A) reseptorer som finnes i sentrale deler av nervesystemet. Stimuleringen virker hemmende for signaloverføring, og gir en sedaterende effekt [177].

Her ble metomidat benyttet på grunn av egenskapen stoffet har til å hemme kortisolsythesen [150, 159, 68].

1.6 Problemstilling

Formålet med denne oppgaven var å kartlegge immunresponsen hos små lakseyngel etter badevaksinering med Yersiniose, med og uten stressreduserende tiltak som sedatering med Aqui-S under håndtering og vaksinering. Det har tidligere blitt vist at Aqui-S har en blokkerende effekt på kortisol ved bruk av doser over 20 mg/L isoeugenol (40 mg/L Aqui-S) [68]. Her ville vi se om bruken av lavdose Aqui-S kan gi adferdsmessige effekter tilsvarende det man ser på stor fisk, og om dette påvirket stressresponsen i form av plasmakortisol. Videre formål var å påvise eventuell immunrespons ved bruk av badevaksine, og om sedatering påvirket immunresponsen.

Problemstillingen kan deles inn i tre delmål:

1. Har en sedativ dose Aqui-S en effekt på stressresponsen i form av kortisol?
2. Påvirker sedasjon immunresponsen etter badevaksinering?

Kapittel 2

Materiale og Metoder

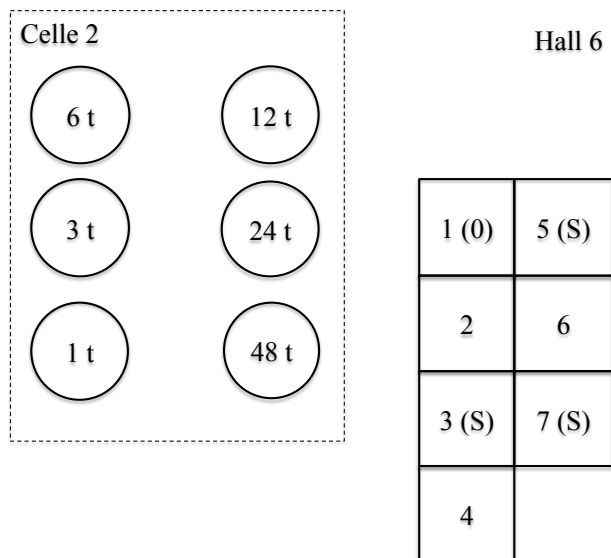
Badeaksinering ble gjennomført ved Mørkvedbukta forskningsstasjon ved Universitetet i Nordland i perioden 21.03.2013 til 30.04.2013. Prøver til kortisolanalysering; ekstraksjon av kortisol og radioimmunoassay (RIA) ble også gjennomført her. Isolasjon og kvantitering av RNA, cDNA-syntese, Real-Time PCR og enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ble gjennomført ved Pharmaqs lokaler i Oslo. RIA og ELISA ble utført av UiN og Pharmaq. I det følgende til det kun derfor reffereres til deres protokoller.

2.1 Forsøksfisk

Rogn ble levert av AquaGen (Tingvoll) og var av typen Atalantic QTL-innOva IPN. Stamfisken var også screenet for ILA/IPN og PD virus. Rogna ble levert til Mainstream Hopen 12.11.2012 som øyerogn. Fisken var ferdig klekket 28.11.2012, og ble startfôret fra 15.01.2013. Vanntemperaturen på rognstadiet og på plommesekkstadiet var 8°C. De to første ukene under startôring var vanntemperaturen 12°C, de neste to ukene 13°C og etter det 14°C. Fisken ble hentet til forskningstasjonen 07.03.2013, hvor den ble fordelt i 7 kar med gjennomstrømming av oppvarmet vann som lå mellom 12 – 14°C gjennom forsøket. Karene var skjermet for innsyn og forstyrrelser utenfra med ugjenomsiktig plast.

Oksygennivået lå gjennom forsøket mellom 80 – 100 % O₂, og var aldri under 80 %. Med unntak av en hendelse i kar 6 etter første badevaksinering da oksygennivået var nede i 25 %, og 31 fisk døde. Utenom dette var det kun registrert 2 dødfisk, kar 4 22.03.2013 og kar 7 08.04.2013.

Snittvekter ble registrert omtrent hver andre uke, og det ble da tatt mer enn 30 fisk fra hvert kar (figur B.1).



Figur 2.1: Forsøksoppsettet. Fisken ble holdt i Hall 6. I kar 1 ble kontrollfisken holdt, i kar 2, 4 og 6 var fisken som ikke ble sedatert og i kar 3, 5 og 7 var fisken som ble sedatert. Ved prøvetaking (etter vaksning) ble fisken overført til Celle 2. Hvert kar inneholdt 6 rør, ett til hvert kar, der fisken ble holdt til prøvetakning.

2.2 Forsøksoppsett

Det ble satt opp 2 forsøksgrupper; en gruppe som ble sedatert ved bruk av en sedativ dose Aqui-S (dose) før den ble vaksinert, og en som ikke ble sedatert før vaksining. I tillegg ble det satt opp en kontrollgruppe som ikke ble vaksinert. Forsøksoppsett er vist i figur 2.1. Før forsøket startet opp ble fisken akklimatisert i 14 dager.

2.3 Badevaksining

I forkant av badevaksiningen ble 6 0-prøver (Pre-stress) tatt ut fra kar 1. Fiskene ble bedøvet i metomidat (5 mg/8 l vann), før de ble avlivet ved slag i hodet. Prøvene ble lagt i en merket plastpose og frøset ned ved -20°C fram til kortisolanalyse. Prosedyre som ble fulgt under badevaksiningen kan ses i tabell 2.1. Den ikke-sedaterne gruppe ble håndtert tilsvarende uten tilsetning av Aqui-S vet. (sedativ). Metodikk og prosedyre ble planlagt i samråd med Scanvacc AS og Pharmaq. Vaksinen benyttet i dette forsøket var levert av Pharmaq, og var en autogen ERM vaksine bestående av formaldehydinaktivert kultur av *Yersinia ruckeri* (serotype O1). Ved prøvetakning ble yngel fra begge gruppene tatt ut etter badevaksiningen (dvs. restitusjon etter 1, 3, 6, 12, 24 og 48 timer). For prøvetakning under restitusjon ble fisken

Tabell 2.1: Prosedyre ved badevaksineringen ved bruk av sedasjon.

Tid	Handling
0	Vannstanden i karene ble senket til 90l, og 5l (konsentrasjon 2.5mg/l isoeugenol) Aqui-S Vet. ble fylt i hvert kar. Vannstanden ble hevet til 100l, før vannet ble slått av. Sedasjonen fikk virke i 20 minutter Vaksine ble målt opp; 80ml/kar.
19	Vannstanden ble senket til 10l.
20	Vaksinen ble fordelt i karene, og vannet ble satt på i 2 minutter.
32	Vannet ble satt på i 5 minutter.
47	Satte vannet på i 3 minutter, og lot det renne.
50	Prøvetakning.

satt i mindre enheter i Celle 2 (Se figur 2.1), og fikk stå der uforstyrret til prøvetakningstidspunktet. Ved prøvetakning ble fisk umiddelbart overført til metomidat (5mg/8l vann). Yngelen ble deretter avlivet ved slag i hodet og lagt i merkede plastposer og frøset ned ved -20°C fram til kortisolanalyse. Det ble også tatt ut prøver for analyse av immunrespons fra hodenyre og andre gjellebue 1 dag og 3 dager etter vaksinerings. Disse prøvene ble lagt i rør med RNAlater, og oppbevart kaldt fram til analysering. RNAlater stabiliserer RNAet. Dette er absoutt forutsetning for å få en korrekt analyse av genuttrykket senere. Øyeblikkelig stabilisering av RNA i biologiske prøver rett etter prøvetakning er nødvendig, da endringer i genuttrykket vil skje på grunn av spesifikke og uspesifikke degraderinger av RNA, samt på grunn av transkripsjonsinduksjon.

2.4 Isolasjon av RNA

Metodikken for isolasjon av RNA er beskrevet i RNeasy[®] Mini Handbook (Qiagen). Denne teknologien kombinerer de selektive bindingsegenskapene til en silika-basert membran med hastigheten til microspinteknologi. Et spesialisert buffer-system med høyt saltinnhold tillater opp til 100 μg av RNA på mer enn 200 basepar å binde til RNeasy silika-membranen. Biologiske prøver lyseres og homogeniseres først ved tilstedeværelse av en høyt denaturerende buffer som inneholder guanidine og thiocyanate. Denne bufferen inaktiverer RNaser øyeblikkelig og sikrer renselse av intakt RNA. Etanol tilsettes for å gi passende bindingsforhold. Prøven påføres deretter på en RNeasy Mini spin column, hvor total RNA binder til membranen og kontaminanter vaskes ut. RNA fortyknes til slutt i 30–100 μl vann. En metallkule (3–7 mm i diameter) ble overført til rør (microsentrifugerør med rund bunn), bit av organ (30mg) ble overført, deretter ble 350 μl Buffer RLT Lysis tilsatt hvert rør. Prøvene ble så homogenisert 2 x 1 minutt i Retsch MM400. Metallkulene ble så tatt

Tabell 2.2: Varmesykluser brukt under cDNA-syntese.

Temperatur	Varighet
25°C	10 minutter
50°C	30 minutter
85°C	5 minutter
4°C	

ut fra prøvene, før de deretter ble sentrifugert i 3 minutter ved 13200 rpm (Eppendorf Centrifuge 4515R). Prøvene ble deretter plassert i QIAcube, med program RNeasy Mini. Til slutt ble prøvene frosset ned ved -80°C .

2.5 Kvantitering av RNA

Konsentrasjonen av RNA ble kvantifisert ved måling av absorbans (A260) ved bruk av Picdrop Application (Picodrop). RNase-fritt vann ble brukt som nullpunkt før første måling og mellom hver 20. måling. RNA ble kvantifisert i 2,5 μl prøvematerial. RNA-konsentrasjonen ble uttrykt som ng/ μl . Tilfredsstillende kvalitet på det isolerte RNAet ble definert som $A_{260}/A_{280} > 1,8$ i henhold til anbefalinger fra produsent av Fast SYBR[®] Green Master Mix Protocol (Applied Biosynthesis). Prøvene ble fortynt til en RNA-konsentrasjonen på 500 ng/ μl og volum på 8 μl , før de ble lagret ved -80°C .

2.6 cDNA-syntese

Ved cDNA (complementary DNA) syntetiseres DNA fra et mRNA (messenger RNA) templat i en reaksjon katalysert av enzymene revers transkriptase og DNA polymerase.

Prosedyren for cDNA-syntese er beskrevet i Superscript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Hver prøve ble tilsatt 10 μl RT Reaction mix og 2 μl RT Enzyme mix. Prøvene ble spunnet ned før de ble plassert i S1000[™] Thermal Cycler og kjørt på programmet ssplat. Varmesyklusene prøvene ble kjørt gjennom er vist i tabell 2.2. Til slutt ble hver prøve tilsatt 180 μl vann, og plassert kaldt.

2.7 RT-PCR

For RT-PCR (real time PCR) ble Fast SYBR[®] Green Master Mix Protocol (Applied Biosystems) benyttet. SYBR Green er et fargestoff som binder til dobbeltrådig DNA. Resultatet av dette er at fluorescensintensiteten øker proporsjonelt med mengden dobbeltrådig PCR-produkt produsert. ROX[™] dye Passive Reference gir en intern referanse SYBR Green kan normalisere seg

Tabell 2.3: Tabellen viser primersekvenser benyttet til RT-PCR. Primerene er fra Eurofins MWG Operin, og er vist i 5' til 3' retning.

Gen	Sekvens (5' - 3')
EFA-F	CCCCTCCAGGACGTTTACAAA
EFA-R	CACACGGCCCACAGGTACA
IL-17AF	TGGTTGTGTGCTGTGTGTCTATGC
IL-17AR	TTTCCCTCTGATTCCTCTGTGGG
IL-1BF	GCTGGAGAGTGCTGTGGAAGA
IL-1BR	TGCTTCCCTCCTGCTCGTAG

Tabell 2.4: Varmesykluser brukt under PCR.

Segment (Antall sykluser)	Temperatur	Varighet	
1 segment (x1)	50°C	i 2 minutter	
2 segment (x2)	95°C	i 2 minutter	Enzymaktivering
3 segment (x45)	95°C	i 15 sekunder	Denaturering Anneal/Extend
	62°C	i 1 minutter	
4 segment (x1)	95°C	i 1 minutt	
	55°C	i 30 sekunder	
	95°C	i sekunder	

etter under data-analysering. Normalisering er nødvendig for å korrigere for fluorescerende svingninger på grunn av endringer i konsentrasjon eller volum. Prøvene ble satt opp i 96-brønners brett for PCR. Ettersom det ble analysert for to ulike gen, ble to ulike mastermixer brukt som inneholdt templat for genene IL-17 α og IL-1 β , og en mastermix som inneholdt templat for et referansegen (EFA) (se tabell 2.3). Mastermixen som ble tilsatt hver prøve inneholdt 12,5 μ l PSG (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG), 0,5 μ l ROX (ROXTM dye Passive Reference), 1,25 μ l Primer Forward og 1,25 μ l Primer Reverse. 15 μ l mastermix ble plassert i hver brønn før 10 μ l cDNA ble tilsatt. For hver prøve ble det kjørt parallellt. Hver plate hadde to brønner som inneholdt NTC (Non Templat Control).

Platene ble kjørt i Stratagene MX3000P (med program MoPro) på varmfrekvenser vist i tabell 2.4.

2.8 Indirekte ELISA

Blodprøver ble tatt av dobbeltvaksinert (vaksinering ved t=0, re-vaksinering ved t=500) fisk etter omtrent 1000 døgngader. Dette tidspunktet ble valgt for å kunne detektere høyest mulig respons, og da en eventuell høyest forskjell mellom de to gruppene (sedatert og ikke sedatert).

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ble utført på 96-brønners

polystyrene microtiter plater (Nucleon™ Surface). Brønnene ble belagt med 100 µl antigen (*Yersinia ruckeri* stokkøsning). Alle brønnene ble vasket 3 ganger med PBST (PBS som inneholder 0.005 % Tween 20) mellom hvert inkuberingssteg (BioTek ELx405). Uspesifikk binding ble hindret med 5 % tørrmelk i PBST i 1 time ved romtemperatur. Plasma fra 15 fisk fra den sedaterte kontrollgruppen ble slått sammen og fortynnet 1:25 i PBST, tilsatt brønnene og inkubert over natten ved 4°C. Antistoffer spesifikk for *Yersinia ruckeri* ble påvist ved å bruke biotinyleret 4c10 mus-anti-laks monoklonale antistoffer (Diatec) fortynnet 1:200 i PBST i 1 time, etterfulgt av inkubering med streptavidin/AP (GE Healthcare, fortynnet 1:4000). Nitrofenylfosfat (NPP) i konsentrasjon 1.0mg/ml ble brukt som substrat, og reaksjonen ble stoppet etter 30 minutter. Avlesning av optisk tetthet (OD) ble utført ved bruk av BioTek EL800 plateleser ved OD₄₀₅, og med Gen5 dataanalyse programvare.

2.9 Ekstraksjon av Kortisol

Fremgangsmåten for ekstraksjon av kortisol på helfisk er basert på metoden beskrevet i fra Development of a whole-body cortisol procedure for determination of stress in golden-shiners, *Notemigonus crysoleucas* [147].

Prøvene ble forbehandlet ulikt etter hvilken størrelse lakseyngelen hadde. Lakseyngel på 2 – 5 gram ble tint, tørket og veiet individuelt før de ble kuttet opp i mindre biter og plassert i Kimax rør. Hver prøve ble tilsatt 3ml PBS (PBS: 0,26 g KH₂PO₄, 2,17 g Na₂HPO₄ – 7H₂O, 8,71 g NaCl justert til 1l med de-ionisert vann ved pH 7,4.). Lakseyngel på > 5 gram ble tint, tørket og veiet individuelt før et transversert snitt ble tatt ut, fra bak gjellene til starten av ryggfinner. Dette ble veiet, kuttet opp i mindre biter og plassert i Kimax rør. 3ml PBS ble tilsatt.

For lipidekstraksjon ble vevsprøven homogenisert i 10 sekunder ved bruk av homogenisator (VWR VDI 12) med dispergeringsselement (S12N-75). Prøven ble tilsatt 7ml etyleter, før ble prøven korket og vortexet i 1 minutt, for å sikre blanding av vev med etyleter, for kortisol-ekstraksjon. Deretter ble prøven sentrifugert i 10 minutter ved 3000 rpm, for å kondensere vevet i bunnen av test-røret. Prøven ble frøset ved –20°C i 2 timer, før vannløselig fraksjon ble dekantert over i 10ml prøverør. Prøverør med eterekstraksjon ble avdampet i avtrekk over natt, pipettert over i tuber og frøset.

2.10 RIA

Konsentrasjonen av kortisol i plasma ble analysert etter en RIA-metode (radioimmunoassay) av Iversen et al. (1998) [67]. [3H]-kortisol (TRK 407, Institutt for energiteknikk, Kjeller) ble benyttet som tracer. Standardrekke (0–59 ng/ml) ble laget av hydrokortison (H 40001, Sigma). Antistoffet ble hentet fra (F3-314) Endocrine Science, Tarzana, USA. Prøvene ble sentrifugert

(Haraeus sepeatech Omnifuge 2.ORS radius 154 mm, rotor 3360) og inkubert ved $1-2^{\text{mathrm}C}$ i 24 timer. Komplekset av antistoff-antigen ble telt i en scintillasjonsteller type Packard Tri Carb 1900 TR. Sensitiviteten på assayet var på 0.5 nmol L⁻¹. Prøver under deteksjonsgrensen ble satt lik sensitiviteten til assayet. Intraassayet var mindre enn 5.3 % og intraassayet var 9.8 % ved henholdsvis 50 nmol L⁻¹. Uspesifikk binding (NSB (non-spesifikk binding)) varierte fra 2.1 – 3.9 % av den totale aktiviteten.

2.11 Statistisk Analyse

All data fra forsøket ble bearbeidet i Microsoft Excel 2008. Data ble laget til grafer, med standardavvik utregnet av Excel.

2.11.1 Kortisol

Statistisk analyse ble gjort ved hjelp av statistikk programmet SPSS (ver. 18.00) og SYSTAT (ver 13.00.05) for Windows. All data ble testet for normalitet og homogenitet ved hjelp av henholdsvis Komogorov-Smirnov test og Levene's test. Hvis nødvendig ble data logtransformert for å møte disse antagelsene. Endring i plasmakortisol fra et tidspunkt til et annet og sedatert gruppe eller ikke (kontroll) ved et gitt tidspunkt ble testet ved analyse av varians (ANOVA). Hvis F-verdene var signifikante ble en Bonferroni post hoc test kjørt for å bestemme om det var forskjeller mellom gruppene. Signifikant forskjell ble bestemt på 0.05 nivå. Alle resultater er uttrykt i gjennomsnitt med standard avvik ($\bar{n} \pm SD$)

2.11.2 RT-PCR

Alle Ct-vediene ble ordnet systematisk i grupper. For hver gruppe ble det gjennomsnittet og standardavviket regnet ut. For å finne det relative genuttrykket til de to genene som det ble undersøkt for ble Delta Delta Ct metoden brukt. Når man bruker denne metoden sammenligner man Ct-vediene man har fått ut i fra PCR men en krontrull (her pre-stress fisken). Ut i fra resultatet kan man se om man har en oppregulering av genet eller ikke. Positiv verdi betyr oppregulering, mens negativ verdi betyr at uttrykket av genet er nedregulert [80]. Delta Delta Ct ble funnet ved hjelp av formel 3.1.

$$\Delta\Delta CT = \left(\frac{2^{(\text{Gjennomsnitt målgen i kontroll} - \text{Målgen i behandlet})}}{2^{(\text{Gjennomsnitt referansegene i kontroll} - \text{Referansegene i behandlet})}} \right) \quad (2.1)$$

Verdiene fra $\Delta\Delta Ct$ metoden ble ordent systematisk. Histogram ble laget for hver gruppe for å se fordelingen (Appendix A). Gjennomsnittet ble regnet ut for hver gruppe, og disse verdiene ble brukt for å lage grafer der man kan sammenligne oppreguleringen av de to genene IL-1 β og IL-17 α . For å se om

det var noen forskjell mellom de sedaterne gruppene og de ikke-sedaterne ble Mann-whitney-testen brukt. Signifikansnivå var satt til 95%. R ble her brukt for å undersøke signifikante forskjeller.

Kapittel 3

Resultater

3.1 Observasjoner

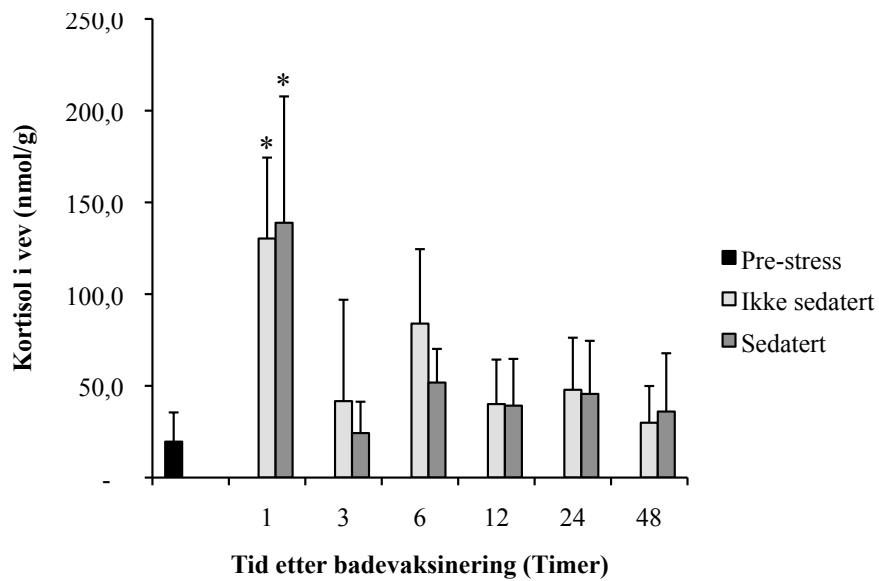
Under badevaksineringen kunne man se en forskjell i oppførsel mellom den sedaterte gruppen og den gruppen som ikke ble sedatert før vaksinerings. Den gruppen som ble sedatert med Aqui-S før vaksinerings stilte seg normalt i karene når vannstanden ble senket og vaksinen tilsatt, svømmende mot strømmen. Gruppen som ikke ble sedatert med Aqui-S før vaksineringsen svømte mye mer rundt i karet og hadde en mer panisk oppførsel.

3.2 Stressrespons Under Vaksinerings

Ved 1. gangs badevaksinerings var kortisolnivået 19.6 ± 15.9 i pre-stressgruppen. Etter En time var det økt til 138.9 ± 68.9 (sedatert) og 130.3 ± 44.1 (ikke sedatert). Etter 3 timer var kortisolnivået synket til 24.3 ± 17.1 (sedatert) og 41.7 ± 55.3 (ikke sedatert). Ved 6 timer var kortisolnivået gått opp til 51.8 ± 18.3 (sedatert) og 83.9 ± 40.6 (ikke sedatert), før det sank til 39.2 ± 25.5 (sedatert) og 40.1 ± 24.2 (ikke sedatert) etter 12 timer. Etter 24 timer var kortisolnivået 45.6 ± 29.0 (sedatert) og 47.9 ± 28.4 (ikke sedatert), og etter 48 timer var det 36.0 ± 31.8 (sedatert) og 29.9 ± 20.0 (ikke sedatert).

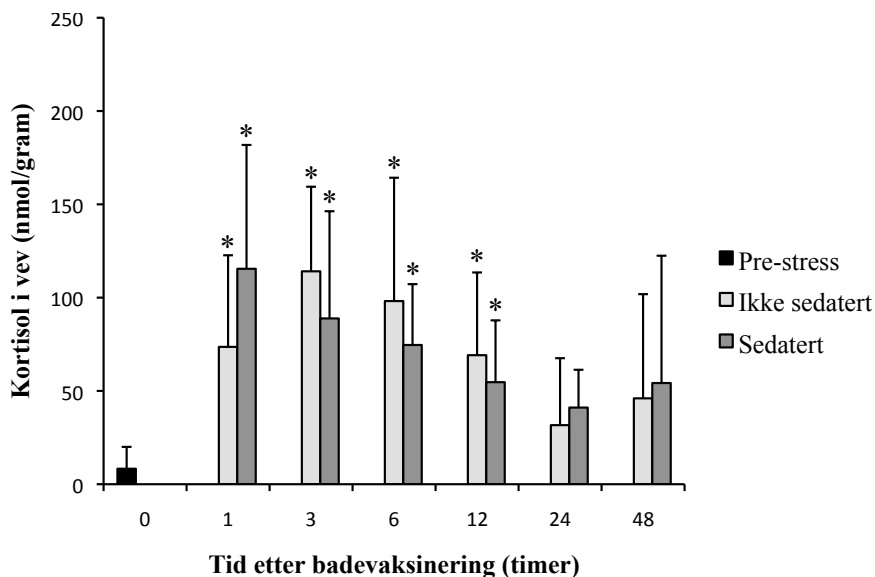
Ved 2. gangs badevaksinerings var kortisolnivået 8.3 ± 11.7 i pre-stressgruppen. Etter En time var det økt til 115.5 ± 66.4 (sedatert) og 73.6 ± 49.1 (ikke sedatert). Etter 3 timer var kortisolnivået synket til 88.9 ± 57.5 (sedatert) og 114.1 ± 45.3 (ikke sedatert). Ved 6 timer var kortisolnivået gått opp til 74.6 ± 32.6 (sedatert) og 98.2 ± 66.1 (ikke sedatert), før det sank til 54.7 ± 33.1 (sedatert) og 69.2 ± 44.3 (ikke sedatert). Etter 24 timer var kortisolnivået 41.4 ± 20.3 (sedatert) og 31.7 ± 35.9 (ikke sedatert), og etter 48 timer var det 54.2 ± 68.2 (sedatert) og 46.0 ± 55.8 (ikke sedatert).

Som figur 3.1 og 3.2 viser var det en signifikant økning i plasmakortisol fra pre-stress til 1 time etter badevaksinerings ved henholdsvis 1. og 2. gangs badevaksinerings. Ved 2. gangs badevaksinerings forble kortisol signifikant for-



Figur 3.1: Kortisolnivå i lakseyngel (2.1 gram) etter 1. gangs badevaksinering mot yersiniose målt ved RIA (antall fisk er vist i tabell B.2) Stjerne på figur indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (kontroll).

høyet i forhold til pre-stress målingene til og med 12 timer etter badevaksinering. Det ble ikke registrert noen signifikante forskjeller mellom den sedater-te gruppen og den ikke sedater-te gruppen ved noen prøvetakningstidspunkt, hverken ved 1. gangs vaksiner-ing eller 2. gangs vaksiner-ing. Stjerne på figur indikerer signifikant forskjell (signifikant forskjell ble bestemt på 0.05 nivå) fra pre-stress (kontroll).



Figur 3.2: Kortisolnivå i lakseyngel (8.0 gram) etter 1. gangs badevaksinering mot yersiniose målt ved RIA (antall fisk er vist i tabell B.3) Stjerne på figur indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (kontroll).

3.3 Immunrespons

3.3.1 Interleukinrespons

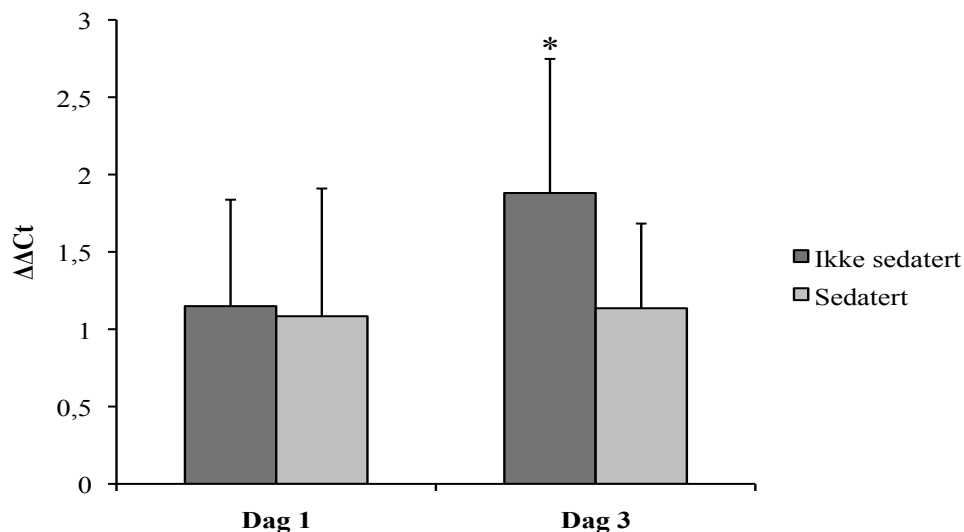
En dag etter vaksinerings var uttrykket av IL-1 β i hodenyre likt i de to eksperimentelle gruppen ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdi 1.1493 (ikke sedatert) og 1.0839 (sedatert), $p=0.5737$). Ved dag 3 var uttrykket av IL-1 β signifikant oppregulert ($p=0.04988$) i den ikke sedaterede gruppen ($\Delta\Delta\text{Ct} = 1.88076$, standardavvik = 0.86698) sammenlignet med den sedaterede gruppen ($\Delta\Delta\text{Ct} = 1.1356$, standardavvik = 0.5475).

I gjellene ble liknende resultater funnet, med et høyere uttrykk ($p = 0.01804$) av IL-1 β ved dag 3 i den ikke sedaterede gruppen ($\Delta\Delta\text{Ct} = 0.9997$, standardavvik = 0.295) i forhold til den sedaterede gruppen ($\Delta\Delta\text{Ct} = 0.747$, standardavvik = 0.09639). Ved dag en var uttrykket av IL-1 β i gjeller likt i de to gruppene ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdi 1.0383 (ikke sedatert) og 0.70706 (sedatert), $p=0.08298$).

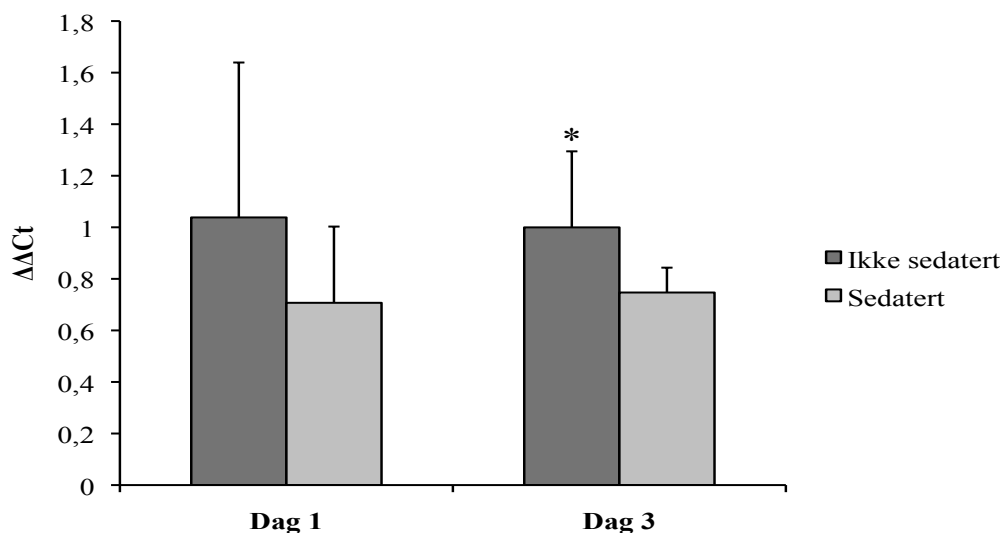
Det ble ikke registrert noen forskjeller i uttrykket av IL-17 α ved dag 1 i hodenyre i de to gruppene ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdi 1.8835 (ikke sedatert) 2.5756 (sedatert), $p=0.5737$). Det ble heller ikke registrert noen forskjell ved dag 3 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdi 4.67067 (ikke sedatert) og 2.17598 (sedatert), $p=0.7209$). Ved dag 3 var standardavviket stort (standardavvik = 5.3053) hos den ikke sedaterede gruppen som indikerer noen høyresponderende fisk i gruppen.

Resultatet i gjellene var liknende som i hodenyre. Det ble ikke registrert

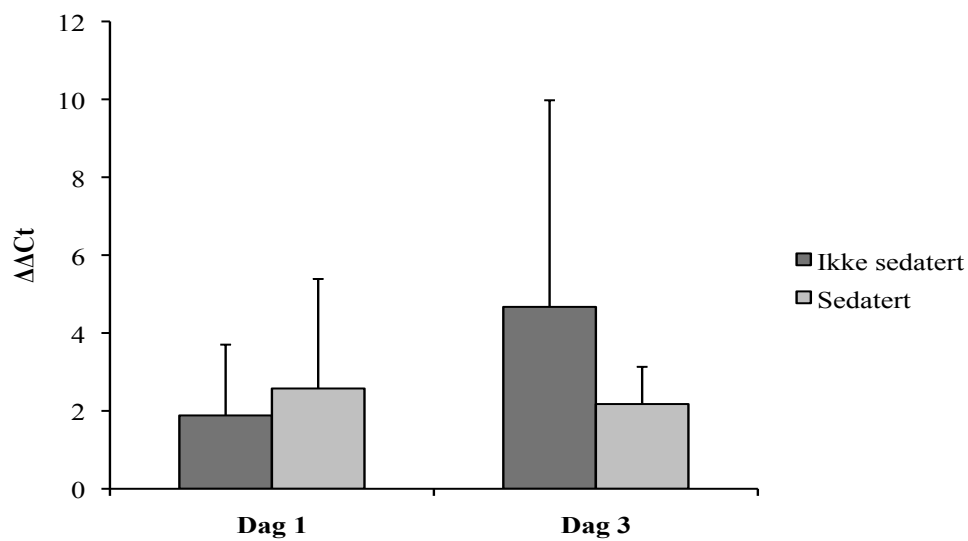
noen forskjell i uttrykket av IL-1 α mellom gruppene ved dag 1 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdi 1.04548 (ikke sedatert) og 0.9819 (sedatert), $p=0.8785$) eller dag 3 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdi 1.0830 (ikke sedatert) og 0.94318 (sedatert), $p=0.4005$).



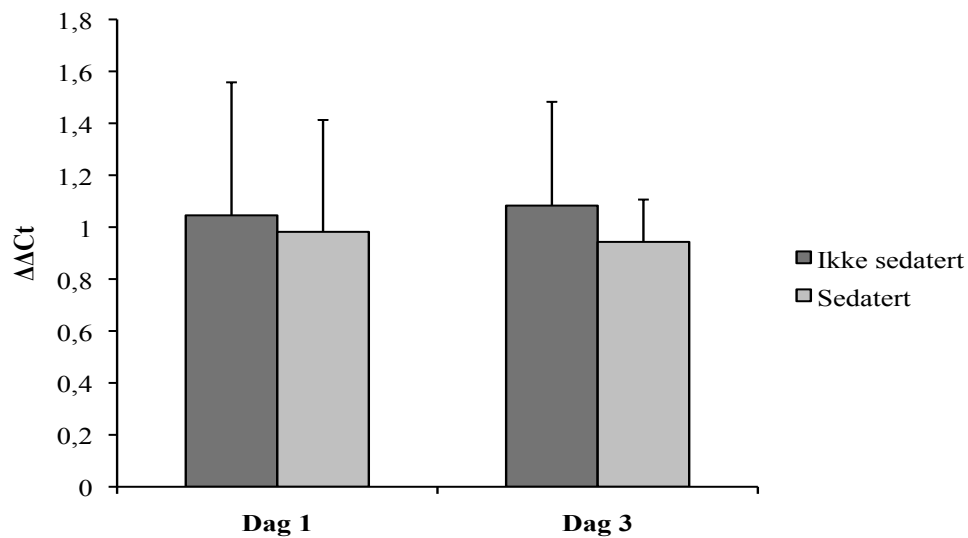
Figur 3.3: Relativt genuttrykk for IL-1b i hodenyre hos Atlantisk laks (n=8) analysert ved RT-PCR. Stjerne (*) indikerer $p < 0.05$



Figur 3.4: Relativt genuttrykk for IL-1b i gjeller hos Atlantisk laks (n=8) analysert ved RT-PCR. Stjerne (*) indikerer $p < 0.05$.



Figur 3.5: Relativt genuttrykk for IL-17a i hodenyre hos Atlantisk laks (n=8) analysert ved RT-PCR. Stjerne (*) indikerer p<0.05.



Figur 3.6: Relativt genuttrykk for IL-17a i gjeller hos Atlantisk laks (n=8) analysert ved RT-PCR. Stjerne (*) indikerer p<0.05.

3.3.2 Antistoffrespons

Resultatene fra antistoffmålingene for spesifikke antistoffer mot *Yersinia ruck-eri* ble utført etter 2. gangs badevaksinering (1000 døgngader) viser pools av 15 fisk, se tabell 3.1. Resultatene (vist i tabell 3.1) *indikerer* at den gruppen som ikke ble sedatert har en høyere antistoffrespons enn den gruppen som ble sedatert under vaksinerings. Blank (brønn hvor det ikke ble tilsatt lakseantistoffer) er trukket fra resultatene.

Tabell 3.1: Antistoffrespons hos dobbelt-vaksinert fisk (vaksinering ved $t=0$, re-vaksinering ved $t=500$ og blodprøvetakning etter omtrent totalt 1000 døgngader). Verdiene viser pools av 15 fisk som ble fortynnet 1:25. Den negative kontrollen er serum fra uvaksinert fisk.

Gruppe	Sedatert	Ikke sedatert	Negativ kontroll
Plate 1 OD ₄₅₀	0.228	0.316	0.186
Plate 2 OD ₄₅₀	0.437	0.557	0.277

Kapittel 4

Diskusjon

Yersiniose er en sykdom som ofte har et akutt forløp hos små yngel i settefiskfasen. Vaksinerer er et av de viktigste forebyggende tiltakene for å hindre utbrudd av sykdommen. Sykdommen rammer derimot ofte fisk før de er store nok til å injeksjonsvaksineres, derfor er immersjonsvaksinerer det beste alternativet da det er kjent at denne metoden gir en god beskyttelse mot Yersiniose. Vaksinen som ble benyttet dette forsøket var en autogen ERM vaksine levert av Pharmaq.

Badevaksinerer innebærer liten håndtering av fisken i forhold til injeksjonsvaksinerer, noe som er positivt i forhold til stress. Men, under vaksinerer må vannstanden senkes, noe som fører til at biomassen i karet blir mye høyere. Dette kan sammen med tilsetningen av vaksinen virke stressende på fisken. I dette forsøket ble fisken delt i to forsøksgrupper, der den ene gruppen ble gitt en sedativ dose med Aqui-S før vaksinerer mens den andre gruppen ikke ble sedatert. I tillegg ble prøver tatt av ubehandlet, uvaksinert fisk (pre-stress). Formålet med dette forsøket var å undersøke om Aqui-S hadde en effekt på stressresponsen målt som kortisolnivå, og om en eventuell stressreduksjon av Aqui-S kunne påvirke immunresponsen. Fisken ble badevaksinert 2 ganger. Mellom 1. gangs og 2. gangs badevaksinerer var det 500 døgngrader. Kortisolnivået ble målt før vaksinerer (pre-stress), og opp til 48 timer etter vaksinerer, både ved 1. og 2. gangs badevaksinerer.

Immunresponsen til badevaksinerer ble analysert som uttrykket av interleukinene IL-1 β og IL-17 α , samt produksjonen av *Yersinia ruckeri* spesifikke antistoffer. Prøver av gjeller og hodenyre for RT-PCR ble tatt 1 og 3 dager etter 1. gangs badevaksinerer, mens antistoffresponsen ble målt ved ELISA 500 døgngrader etter 2. gangs badevaksinerer.

4.1 Kortisol

Kortisol ble målt ved bruk av RIA. Ved 1. gangs badevaksinerer ble kortisol ekstrahert fra hel yngel, mens ved 2. gangs badevaksinerer var yngelen blitt

for stor og derfor ble et tranverst snitt av yngelen, fra bak gjellene til starten av ryggfinnen, brukt til ekstraksjon av kortisol.

Normalt vil kortisolnivået i blodet forhøyes 5 minutter etter at stressresponsen har startet og kan forbli forhøyet i flere timer. Etter dette følger en rekke tilpasninger i fiskens fysiologi (inkludert endringer i metabolismen av proteiner, lipider og karbohydrater), som fører til at kortisolnivået vil gå tilbake til hvilenivå [112]. De fysiologiske responsene til akutt stress består av endringer i der metabolismen går fra en anabolsk tilstand (opptak og lagring av energi) til en katabolsk tilstand (nedbrytning av energireserver) [110]. Ved akutt stress til varigheten av stressoren vanligvis vare fra minutter til maks noen timer [110]. Varigheten av stressoren er betydelig kortere enn den fysiologiske stressresponsen, hvor enkelte komponenter kan vare lengre enn en uke. Denne økningen i kortisolnivået kan man se i dette forsøket også. Det er en høy økning i kortisolnivået 1 time etter vaksinerings, før kortisolnivået begynner å synke. Selv om kortisolnivået varierer litt fra hvert prøvetaknings-tidspunkt, og kortisolnivået ikke når samme nivå som pre-stress i løpet av forsøksperioden, kan man anta at kortisolnivået ville nådd pre-stressnivået dersom man hadde tatt prøver ved senere tidspunkt.

Resultatene av analyseringen viste at det ikke var noen signifikante forskjeller mellom den sedaterte og den ikke sedaterte gruppen, hverken ved 1. eller 2. gangs badevaksinerings. Grunnen til at det ikke ble registrert noen effekt av Aqui-S på kortisolnivået kan være at dosen som ble brukt var for lav. I tidligere forsøk er det blitt vist at en dose på ≥ 20 mg/L isoeugenol (40 mg/L Aqui-S) er nødvendig for å blokkere plasmakortisol hos laks [68]. Atlantisk laks (45 gram, 5.4°C) ble eksponert for vann med ulike konsentrasjoner av ulike anestetiske midler (metomidat, clove oil (nellikolje), Aqui-S™ og Benzoak®) og tiden det tok før fisken nådde de ulike stadiene av anestesi ble registrert. Det ble registrert at en dose på 10 mg/L isoeugenol var for lavt til å blokkere kortisolnivået, mens en dose på 20 mg/L isoeugenol var tilstrekkelig for å få en effekt.

I dette forsøket var fisken mindre (2 – 20 gram) enn fisken i forsøket beskrevet over og en dose på 2.5 mg/L isoeugenol benyttet. Ofte er effektiviteten til anestetiske midler relatert til gjellearealet i forhold til kroppsvekt, og større individer krever større konsentrasjoner enn mindre individer [25]. Effektiviteten til anestetiske midler varierer også mellom arter. Det er vist at en konsentrasjon på 5 mg/L Aqui-S (2.5 mg/L isoeugenol) reduserte kortisolnivået hos karpe, henholdvis ved akutt oksygenmangel og med begrenset bevegelsesrom [151]. Her ser det ut til at selv om fisken var mindre enn fisken i forsøket til Iversen et. al [68] så kan det være nødvendig med en høyere dose Aqui-S for at kortisolresponsen skal blokkeres.

Selv om kortisolresponsen ikke ble blokkert, så ble den sedaterte fisken roligere under vaksinerings. Dette kan være bra i situasjoner der fisken skal håndteres, og for å forhindre mekaniske skader. Når fisken blir roligere vil den også bruke mindre oksygen og mindre CO₂ vil produseres, og miljøet

i karet vil være bedre.

4.2 Praktisk Bruk av Aqui-S

Scanvacc markedsfører Aqui-S som et middel som kan brukes under prosedyrer som kan være stressende for fisk, som sortering, flytting, transport, telling av lakselus, stryking av stamfisk og vaksineringsprosedyrer. Effekten skal være at fisken blir rolig og håndterbar uten å miste svømmeevne, i tillegg skal Aqui-S hindre høye kortisolnivåer. Svanvacc har gjort flere praktiske forsøk i stor skala i forbindelse med sortering og flytting av fisk, der man kan se en forskjell i oppførsel til fisken som er sedatert med Aqui-S i forhold til fisk som ikke er sedatert [140]. Som nevnt over kan dette være positivt med at det er mindre sjanse for mekaniske skader når fisken er rolig.

Aktuell sedateringskonsentrasjon er 5 ml/m^3 , noe som gjør at kostnaden per m^3 blir omtrent 19.50 nok (1 liter Aqui-S koster 3900 nok). Dersom man skal sedatere et lite kar i et anlegg (40 m^3), blir kostnaden per kar 780 nok. Har man mange kar, som kanskje skal behandles flere ganger, kan kostnadene bli betydelige.

4.3 Immunrespons

Generelt ser man en lav respons ved immersjonsvaksiner på grunn av manglende adjuvanter som induserer immunsystemet, i motsetning til injeksjonsvaksiner der det der vanlig å tilsette adjuvanter. Men en kunne forventet en høyere immunrespons, da det tidligere er vist at vaksinen gir en god beskyttelse i smitteforsøk (interne resultater fra Pharmaq, $\text{RPS}_{60} \geq 60\%$. RPS: *relative prosent survival*).

Siden det ikke var noen forskjeller i kortisolnivå hos forsøksgruppene er det vanskelig å si om kortisol har hatt en innvirkning på immunresponsen. Derimot er det mulig at Aqui-S har påvirket immunresponsen, da det generelt var en høyere immunrespons, både medfødt respons (interleukiner) og adaptiv respons (antistoffer), hos den ikke sedaterte gruppen. Muligens har Aqui-S hatt en negativ effekt på opptaket av vaksinen ettersom man ser disse forskjellene i immunrespons mellom forsøksgruppene.

Man vet lite om hvordan Aqui-S (isoeugenol) påvirker vaksineringsprosedyrer, da det ikke er gjort noen forsøk på dette tidligere. Med informasjon i pakningsvedlegget til Aqui-S som utgangspunkt, antas det at isoeugenol vil orientere seg som en olje-i-vann (O/W) emulsjon, hvor polysorbat 80 bidrar til dispersjon av oljen. Det anses derimot som lite sannsynlig at O/W-emulsjonen vil binde opp vaksineantigenene ¹.

¹K.E. Løkling, Pharmaq, personlig kommentar.

4.3.1 Interleukinrespons

Begge interleukinene som ble brukt som mål på immunresponsen er pro-inflammatoriske cytokiner som skilles ut tidlig i immunresposen. Begge bidrar også til å induserer andre inflammatoriske cytokiner [37, 60]

Etterfulgt badevaksinering ble det registrert oppregulering av IL-1 β i hodenyre og i gjeller 3 dager etter vaksinering i den gruppen som ikke ble sedatert med Aqui-S.

Man kan jo spørre seg om antallet fisk som ble analysert i dette forsøket var stort nok for å få et representativt bilde på immunresponsen. Utvalgsstørrelsen i dette forsøket var 8 fisk/prøvetidspunkt/eksperimentelle gruppe. I forsøk som dette, hvor svært små forskjeller i respons skal undersøkes er det en fordel om man inkluderer både flere prøvetidspunkt og flere uttak/gruppe/tidspunkt. Ofte vil store individuelle forskjeller i respons (for eksempel IL-17 α , dag 3, ikke sedatert og IL-1 β , dag 3, ikke sedatert) gjøre det svært vanskelig å oppnå statistisk signifikans mellom grupper på grunn av store standardavvik. De store standardavvikene tyder på at det har vært høy oppregulering av genene i enkeltfisk.

Gjellene er sammen med huden og tarmen et viktig opptakssted ved immersjonsvaksinering og infeksjoner [6], men en høyere oppregulering av interleukiner i hodenyren i forhold til gjellene kan tyde på at gjellene er et mindre viktig sted for prosessering av antigener enn for igangsettelse av adaptive responser [70]. Alternativt så er aktiveringen av den mukosale immuniteten i gjelleepitelet veldig effektiv, noe som fører til rask eliminering av antigenene [21]. Prøvetidspunktene i dette forsøket viser bare øyeblikksbilde i gjellene 1 og 3 etter vaksinering, men ikke hva som skjer i tiden mellom. En kan spekulere om immunresponsen i gjellene kan ha vært høyere det første døgnet etter eksponering for antigener, eller etter den siste prøvetakningen i hodenyren. Hadde man hatt flere prøvetakningstidspunkt man muligens detektert et annet mønster i regulering av interleukinuttrykkene.

I et forsøk gjort på Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) infisert med *Yersinia ruckeri* ved immersjon ble det vist at genuttrykket av IL-1 α og reseptoren IL-1 α R i gjellene var oppregulert 24 timer etter at fisken var eksponert for bakterien, men var nedregulert etter 48 timer. *Yersinia ruckeri* kunne påvises i gjellene få timer etter infeksjon. Det så ut som om mengden bakterier sank raskt, og var nesten fraværende etter 48 timer. Siden både uttrykket av IL-17 α og IL-17 α R var nedregulert, ble det her foreslått at responsen induert av dette cytokinet ikke er nødvendig i lengre periode. Det ble også foreslått at en rask negativ *feedback* er tilstede for å kontrollere utskillelsen av IL-17 α , muligens på grunn av de mange funksjonene gjellene har og at immunfunksjoner kan forstyrre transport av oksygen og ioner. I hodenyren var uttrykket av IL-1 α og reseptoren IL-1 α R oppregulert både 24 og 48 timer etter eksponering [98]. Muligens er det noe likende som har skjedd i dette forsøket ettersom det ikke er noen oppregulering i genuttrykk fra dag 1 til

3. Dersom det finnes slike tilbakekoblingsmekanismer som raskt nedregulerer uttrykket av IL-17 α ville det (som nevnt over) vært nødvendig med flere prøvetidspunkt for å registrere en oppregulering.

Siden det ikke var noen forskjell i kortisolnivå mellom den sedaterte og den ikke sedaterte gruppen er det vanskelig å konkludere om kortisol har påvirket uttrykket av interleukiner. Men det er vist tidligere at uttrykket av IL-1 β og IL-1RI (resptor) ble oppregulert etterfulgt stress i karpe [94], og hvordan en slik forskjell i kortisol ville påvirke immunresponsen i dette forsøket er vanskelig å si.

4.3.2 Antistoffrespons

Hos laksefisk er antistoffresponsen normalt høyest mellom 500 og 1500 døgngader etter vaksinerings. I dette forsøket ble antistoffresponsen undersøkt 500 døgngader etter 2. gangs badevaksinerings (altså etter totalt 1000 døgngader), både hos fisk som ble sedatert og ikke sedatert før vaksinerings. Under de forutsetningene at prøvene ble analysert i pools, viste resultatene at den ikke sedaterte gruppen hadde en litt høyere antistoffrespons enn den sedaterte gruppen. Denne trenden er lik det man registrerte i RT-PCR resultatene der den ikke sedaterte gruppen generelt viste en høyere respons på vaksinerings (høyere oppregulering av interleukiner) enn den sedaterte gruppen.

De 15 prøvene fra hver gruppe ble analysert på to forskjellige microtiterplater, og man må være forsiktig med å sammenlikne resultatene når forskjellene er så små, selv med en positiv kontroll. Poolene ble derimot kjørt på samme plate og disse er sammenliknbare. Selv om man ikke kan utføre statistiske analyser på pools, så gir disse resultatene en indikasjon på hvordan sedaterings med Aqui-S påvirker responsen til vaksinerings. Tilsynelatende er antistoffresponsen høyere i den ikke sedaterte gruppen i forhold til den sedaterte gruppen.

I et tidligere forsøk på regnbueørret var antistoffresponsen høyest 8 og 12 uker etter dyppvaksinerings mot Yersiniose. Vanntemperaturen i dette forsøket var 13°C, noe som tilsvarer omtrent 730 og 1100 døgngader [122]. Prøvetidspunktene mellom dette forsøket på regnbueørret og forsøket her, gjort på atlantisk laks, er med andre ord ganske like. Likevel er det en forskjell i antistoffresponsen. Dette kan skyldes en forskjell mellom artene laks og regnbueørret.

I tidligere forsøk, der kortisol ble administrert oralt til masu salmon (*Oncorhynchus masou*), ble det registrert at kortisol hemmet konsentrasjonen av immunoglobuliner (antistoffer) [103]. Selv om sedasjon med Aqui-S ikke påvirket kortisolnivået kan det se ut til at Aqui-S har påvirket antistoffresponsen i dette forsøket. Som nevnt over er det ikke kjent hvordan Aqui-S påvirker vaksinerings, og det ville vært en fordel å ha gjort flere forsøk før man benyttet middelet under badevaksinerings i stor skala.

4.4 Konklusjon

- I dette forsøket ble det vist at en sedativ dose (2.5 mg/L isoeugenol) av AQUI-S ikke var tilstrekkelig til å ha en effekt på kortisolnivået hos lakseyngel.
- Fisk som ikke ble sedatert med AQUI-S hadde generelt en høyere immunrespons.
- Gruppen vaksinert uten AQUI-S hadde generelt en høyere immunrespons enn den sedaterte gruppen, og det ser derfor ikke ut til at en sedativ dose AQUI-S har hatt en positiv effekt på de tidlige immunresponsene (interleukiner) og de sene adaptive immunresponsene (antistoffer).

Bibliografi

- [1] Abbas, A.K. & A.H. Lichtman. 2009. *Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System*. Updated Third Edition. Saunders Elsevier.
- [2] Adams, S.M. 1990. *Status and use of biological indicators for evaluating the effect of stress in fish*. American Fisheries Society Symposium Series. 8: 1-8.
- [3] Afonso, A., J. Silva, S. Lousada, A.E. Ellis & M.T. Silva. 1998. *Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Fish and Shellfish Immunology, 8, 319-338.
- [4] Agius, C. 1980. *Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish*. Journal of Zoology, London, 191, 11–31.
- [5] Agius, C. & R.J. Roberts. 2003. *Melano-macrophage centres and their role in fish pathology*. Journal of Fish Disease, 26, 499-509.
- [6] Anderson, D.P., A.G. Zapata & M. Wisniewski. 1985. *Antigen uptake by gill cells of Atlantic salmon given bath immunizations with Yersinia ruckeri*. American Zoologist, 25, 75-75.
- [7] Aucoutuier, J., L. Dupuis & V. Ganne. 2001. *Adjuvants designed for veterinary and human vaccines*. Vaccine, 19, 2666-2672.
- [8] Avcı, H. & S.S. Birincioglu. 2005. *Pathological findings in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) experimentally infected with Yersinia ruckeri*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29, 1321–1328.
- [9] Barton, B.A. 2002. *Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids*. Integrative and Comparative Biology 42:517-525.
- [10] Barton, B.A., C.B. Schreck, R.D. Ewing, A.R. Hemmingsen & R. Patiño. 1985. *Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in coho*

salmon, Oncorhynchus kisutch. General and Comparative Endocrinology, 59, 468-471.

- [11] Barton, B.A., C.B. Schreck & L.A. Sigismondi. 1986. *Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon*. Transactions of the American Fisheries Society, 115, 245-251.
- [12] Barton, B.A. & G.K. Iwama. 1991. *Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids*. Annual Review of Fish Diseases, 1, 3-26.
- [13] Barton, B.A., R.E. Peter & C.R. Paulencu. 1980. *Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (Salmo gairdneri) at rest, and subjected to handling, confinement, transport and stocking*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37(5), 805-811.
- [14] Beitinger, T.L. & R.W. McCauley. 1990. *Wholeanimal physiological processes for assessment of stress in fishes*. Journal of Great Lakes Research, 16, 542-575.
- [15] Berg, A., Ø. Bergh, P.G. Fjellidal, T. Hansen, J.E. Juell & A. Nerland. 2006. *Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk - Effekter og bivirkninger*. Utredning til Mattilsynet. Fisken og havet nr. 9.
- [16] Boes, M. 2000. *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*. Molecular Immunology 37, 1141-1149.
- [17] Bradford C.S., M.S. Fitzpatrick & C.B. Schreck. 1992. *Evidence for ultra-short-loop feedback in ACTH-induced interrenal steroidogenesis in coho salmon: Acute self expression of cortisol secretion in vitro*. General and Comparative Endocrinology, 87, 292-299.
- [18] Brattgjerd, S. & Ø. Evensen. 1996. *A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of Vibrio salmonicida in the head kidney phagocytes of experimentally infected Atlantic salmon, Salmo salar L.* Veterinary Pathology 33, 55-65.
- [19] Brudeseth, B.E., R. Wiulsrød, B.N. Fredriksen, K. Lindmo, K.E. Løkling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan & K. Gravningen. 2013. *Status and future perspective of vaccines for industrialised fin-fish farming*. Fish and Shellfish Immunology, 35, 1759-1768.
- [20] Busch, R.A. 1997. *Polyvalent vaccines in fish: the interactive effects of multiple antigens*. Developments in Biological Standardization, 90, 245-256.

- [21] Chettri, J.K., M.K. Daida, P.W. Kania & K. Buchmann. 2012. *Differential immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen Yersinia ruckeri*. *Developmental and Comparative Immunology*, 36, 463-474.
- [22] Chettri, J.K., S. Deshmukh, L. Holten-Andersen, R.M. Jafaar, I. Dalsgaard & K. Buchmann. 2013. *Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against Yersinia ruckeri O1 biotype 2 infections*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 154, 42-47.
- [23] Chrousos, G.P. 1998. *Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptive responses*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 311-335.
- [24] Coquet, L., P. Cosette, G.A. Junter, E. Beucher, J.M. Saiter & T. Jouenne. 2002. *Adhesion of Yersinia ruckeri to fish farm materials: influence of cell and material surface properties*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26, 373-378.
- [25] Coyle, S.C., R.M. Durborow & J.H. Tidwell. 2004. *Anesthetics in Aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center. SCRAC Publication No. 3900.
- [26] Dannevig, B.H., A. Lauve, C.M. Press & T. Landsverk. 1994. *Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells*. *Fish and Shellfish Immunology* 4, 3-18.
- [27] Davidson, G.A., A.E. Ellis & C.J Secombes. 1993. *Route of immunisation influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Developmental and Comparative Immunology*, 17, 373-376.
- [28] Davidson, G.A., A.E. Ellis & C.J Secombes. 1993. *Novel cell types isolated from the skin of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 42, 301-306.
- [29] Davidson, G.A., S.H. Lin, C.J Secombes & A.E. Ellis. 1997. *Detection of specific and 'constitutive' antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (Limanda limanda)*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58, 363-374.
- [30] Davies, K.B. & G.N. Frerichs. 1989. *Morphological and bio-chemical differences among isolates of Yersinia ruckeri obtained from wide geographical areas*. *Journal of Fish Diseases*, 12, 357-365.

- [31] Davis, K.B, H. Clay, J.L. Lewis, N. Ghori, P. Herbomel & L. Ramakrishnan. 2002. *Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading initiation of granuloma formation in zebrafish embryos*. *Immunity* 17, 693-702.
- [32] Davis, K.B. & N.C. Parker. 1986. *Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115, 494-499.
- [33] De Veer, M.J., M. Holko, M.Frevel, E. Walker, S. Der, J.M. Paranjape, R.H. Silverman & B.R.G. Williams. 2001. *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microassays*. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 912-920.
- [34] Dhabhar, F.S. 2002. *Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking and cytokines*. *Brain Behavior and Immunity*, 16, 785-798.
- [35] Dhabhar, F.S. & B.S. McEwen. 1997. *Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo; a potential role for leukocyte trafficking*. *Brain Behavior and Immunity*, 11, 286-306.
- [36] Diaz-Rosales, P., S. Bird, T.H. Wang, K. Fujiki, W.S. Davidson, J. Zou & C.J. Secombes. 2009. *Rainbow trout interleukin-2: cloning, expression and bioactivity analysis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27, 414-422.
- [37] Dinarello, C.A. 1997. *Interleukin-1*. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 8(4), 253-265.
- [38] Donaldson, E.M. 1981. *The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish*. I: A.D. Pickering (ed.), *Stress and fish*, pp. 11-47. Academic Press, new York.
- [39] Ellis, A.E. 1980. *Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L.* *Journal of Fish Diseases* 3, 413-426.
- [40] Ellis, A.E. 1980. *Fish vaccination*. *Aquaculture Information Series*, 4, Department of Agriculture and Fisheries for Scotland.
- [41] Ellis, A.E. 2001. *Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria*. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827-839.
- [42] Ellis, A.E. & M.A.B. de Sousa. 1974. *Phylogeny of the lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice*. *European Journal of Immunology*, 4, 338-343.
- [43] Ellis, A.E., R.J. Roberts & P. Tytler. 1989. *The anatomy and physiology of teleosts*. I: *Fish Pathology* (R. J. Roberts ed) pp. 13-55.

- [44] Espenes, A., C.M. Press, B.H. Dannevig & T. Landsverk. 1995. *Investigation of the structural and functional features of splenic ellipsoids in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Cell and Tissue Research 279, 469–474.
- [45] Espenes, A., C.M. Press, B.H. Dannevig & T. Landsverk. 1995. *Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Cell and Tissue Research 282, 41–48.
- [46] Eyerich, S., K. Eyerich, A. Cavani & C. Schmidt-Weber. 2010. *IL-17 and IL-22: siblings, not twins*. Trends in Immunology, 31, 354-361.
- [47] Fänge, H.W. 1986. *Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae)*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 12, 153-161.
- [48] Fast, M.D., S. Hosoya, S.C. Johnson & L.O.B. Afonso. 2008. *Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (Salmo salar L.) subjected to short- and long-term stress*. Fish and Shellfish Immunology, 94, 194-204.
- [49] Ferguson, H.W. 1989. *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in disease of teleost*. Iowa State University Press, Ames. Iowa, USA. 5-103.
- [50] Ferguson, H.W. 1976. *The relationship between ellipsoids and melanomacrophage centres in the spleen of turbot (Scophthalmus maximus)*. Journal of Comparative Pathology 86, 377–380.
- [51] Ferreira, J.T., H.J. Schoonbe & G.L. Smit. 1984. *The uptake of the anesthetic benzocaine hydrochloride by the gills and the skin of three freshwater fish species*. Journal of Fish Biology, 25, 35-41.
- [52] Fischer, U., K. Utke, T. Somamoto, B. Köllner, M. Ototake & T. Nakanishi. 2006. *Cytotoxic activities of fish leucocytes*. Fish and Shellfish Immunology, 20, 209-226.
- [53] Fletcher, T.C. & A. White. 1973. *Antibody production in the plaice after oral and perenteral immunization with Vibrio anguillarum antigens*. Aquaculture, 1, 417-428.
- [54] Fryer J.N. & R.E. Peter. 1977. *Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish*. III. Hypothalamic cortisol implant studies. General and Comparative Endocrinology, 33, 215-225.
- [55] Frøystad, M.K., M. Rode, T. Berg & A. Gjøen. 1998. *A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages*. Developmental and Comparative Immunology, 22, 533-549.

- [56] Furones, M.D., C.J. Rodgers & C.B. Munn. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. Annual Review of Fish Diseases, 3, 105–125.
- [57] Gamperl, A.K., M.M. Vijayan & R.G. Boutilier. 1994. *Experimental control of stress hormone levels in fishes: Techniques and applications*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4, 215-255.
- [58] Goede, R.W. & B.A. Barton. 1990. *Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition in fish*. American Fisheries Society Symposium, 8, 93-108.
- [59] Grace, M.F. & M.J. Manning. 1980. *Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, Salmo gairdneri*. Developmental and Comparative Immunology 4, 255–264.
- [60] Gunimaladevi, I., R. Savan & M. Sakai. 2006. *Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish*. Fish and Shellfish Immunology, 21, 393-403.
- [61] Hansen, J.D., E.D. Landis & R.B. Phillips. 2005. *Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications of a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 102, 6919-6924.
- [62] Herraез, M.P. & A.G. Zapata. 1986. *Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish Carassius auratus*. Veterinary Immunology and Immunopathology 12, 117–126.
- [63] Horne, M.T. 1997. *Technical aspects of the administration of vaccines*. Developments in Biological Standardization, 90, 79-89.
- [64] Horne, M.T. & A.C. Barnes. 1999. *Enteric redmouth disease (Y. ruckeri)*. I Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (ed. av P.T.K. Woo & D.W. Bruno), pp. 455–477. CABI Publishing, Oxfordshire.
- [65] Horsberg, T.E. & O.B. Samuelson. 1999. *Behandling*. In: Poppe, T. (ed), Fiskehelse og Fiskesykdommer. Universitetsforlaget, Oslo, Norway, pp. 324-338.
- [66] Hunter, V.A., M.D. Knittel & J.L. Fryer. 1980. *Stress-induced transmission of Yersinia ruckeri infection from carriers to recipient steelhead trout, Salmo gairdneri Richardson*. Journal of Fish Diseases, 3, 467–472.
- [67] Iversen, M., B. Finstad & K.J. Nilssen. 1998. *Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts*. Aquaculture, 168, 387–394.

- [68] Iversen, M., B. Finstad, R.S. McKinley & R.A. Eliassen. 2003. *The efficacy of metomidate, clove-iol, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity*. Aquaculture, 221, 549-566.
- [69] Johansen, R. (red). 2013. *Fiskehelserapporten 2012*. Oslo: Veterinærinstituttet.
- [70] Khimmakthong, U., S. Deshmukh, J.K. Chettri, A.M. Bojesen, P.W. Kania, I. Dalsgaard & K. Buchmann. 2013. *Tissue specific uptake of inactivated and live Yersinia ruckeri in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Visualization by immunohistochemistry and in situ hybridization*. Microbial Pathogenesis, 59-60, 33-41.
- [71] Kitani, A., K. Chua, K. Nakamura & W. Strober. 2000. *Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/regulatory cell 1T cells*. Journal of Immunology, 165, 691-702.
- [72] Korenaga, H., T. Kono & M. Sakai. 2010. *Isolation of seven Il-17 ligand and receptors: a review*. Fish and Shellfish Immunology 31(5), 809-818.
- [73] Kurath, G. 2008. *Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals*. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 27(1), 175-196.
- [74] Laing, K.J. & J.D. Hansen. 2011. *Fish T cells: recent advances through genomics (rev)*. Developmental and Comparative Immunology, 35, 1282-1295.
- [75] Lamers, C.H.J. & M.J.H. De Haas. 1985. *Antigen localization in the lymphoid organs of carp (Cyprinus carpio)*. Cell and Tissue Research 242, 491-498.
- [76] LaPatra, S. 2004. *Current trends in immunotherapy and vaccine development for viral disease of fish*. I: Leung, K.Y. (editor). Current Trends in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases. World Scientific Publishing Co. Pte. LTD, Singapore, 363-389.
- [77] Leach, G.J. & M.H. Taylor. 1980. *The role of cortisol in stress-induced metabolic changes in Fundulus heteroclitus*. General and Comparative Endocrinology, 42, 219-227.
- [78] Li, J., D.R. Barreda, Y.A. Zhang, H. Boshra, A.E. Gelman, S. LaPatra, L. Tort & J.O. Synner. 2006. *B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal activities*. Nature Immunology 7, 1116-1124.
- [79] Lillehaug, A., S. Nygaard, G. Eggset & T. Poppe. 1999. *Vaksinasjon*. I: Poppe, T. (ed), Fiskehelse og Fiskesykdommer. Universitetsforlaget, Oslo, Norway, 288-301.

- [80] Livak, K.J. & T.D. Schmittgen. 2001. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method*. *Methods*, 25, 402–408.
- [81] Lobb, C.J. 1987. *Secretory immunity induced in catfish *Ictalurus punctatus*, following bath immunization*. *Developmental and Comparative Immunology*, 11, 727-738.
- [82] Lo, D., L. Feng, M.J. Carson, M. Crowley, M. Pauza, A. Nguyen & C.R. Reilly. 1999. *Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal*. *Immunological Reviews*, 169, 225-239.
- [83] Lorenzen, N. & S.E. LaPatra. 2005. *DNA vaccines for aquacultured fish*. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 24(1), 201-213.
- [84] MacArthur, J.I., T.C. Fletcher & A.W. Thomson. 1983. *Distribution of radiolabelled erythrocytes and the effect of temperature on clearance in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.)*. *Journal of the Reticuloendothelial Society* 34, 13–21.
- [85] Magnadottir, B. 2006. *Innate immunity of fish*. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 137-151.
- [86] Magnadottir, B. 2010. *Immunological control of fish diseases*. *Journal of Marine Biotechnology* 12, 361-379.
- [87] Martin, S.A.M., J. Zou, D.F. Houlihan & C.J. Secombes . 2007. *Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-II macrophage cells as revealed by transcriptome profiling*. *BCM Genomics* 8.
- [88] Mathew, J.A., Y.X. Guo, K.P. Goj, J. Chan, B.M. Verburg van Kemenade & J. Kwang. 2002. *Characterisation of a monoclonal antibody to carp *IL-1beta* and the development of a sensitive capture ELISA*. *Fish and Shellfish Immunology* 13, 85-95.
- [89] Maule, A.G., C.B. Schreck, C.S. Bradford & B.A. Barton. 1988. *Physiological effects of collecting and transporting emigrating juvenile chinook salmon past dams on the Colombia River*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 117, 245-261.
- [90] Maule, A.G., R.A. Tripp, S.L. Kaattari & C.B. Schreck. 1989. *Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)*. *Journal of Endocrinology*, 120, 135–142.
- [91] Mazeaud, M.M., F. Mazeaud & E.M. Donaldson. 1977. *Primary and secondary effects of stress in fish*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106, 201-212.

- [92] Medzhitov, R. & C.A. Janeway Jr. 2002. *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. *Science*, 296, 298-300.
- [93] Meseguer, J., A. Lopez-Ruiz & A. Garcia-Ayala. 1995. *Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): an ultrastructural and cytochemical study*. *Anatomical Record* 241, 303–309.
- [94] Metz, J.R., M.O. Huising, K. Leon, B.M.L. Verburg-van Kemenade & G. Flik. 2006. *Central and peripheral interleukin-1 β receptor I expression and their role in the acute stress response in common carp, *Cyprinus carpio* L.*. *Journal of Endocrinology*, 191, 25-35.
- [95] Midtlyng, P., L.J. Reitan & L. Speilberg. 1996. *Experimental studies on the efficacy and side effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 6, 335-350.
- [96] Mitchell, H. 1995. *Choosing a furunculosis vaccine: points to consider*. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 3, 30-37.
- [97] Mommsen, T.P., M.M. Vijayan & T.W. Moon. 1999. *Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- [98] Monte, M.M., T. Wang, J.W. Holland, J. Zou & C.J. Secombes. 2013. *Cloning and Characterization of Rainbow Trout Interleukin-17A/F2 (IL-17A/F2) and IL-17 Receptor A: Expression during Infection and Bioactivity of Recombinant IL-17A/F2*. *Infection and Immunity*, 81(1), 340–353.
- [99] Moseley, T.A., D.R. Haudenschild, L. Rose & A.H. Reddi. 2003. *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 14, 155–174.
- [100] Mulero, V. & J. Meseguer. 1998. *Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)*. *Fish and Shellfish Immunology* 8, 143-156.
- [101] Murphy, P.M., M. Baggiolini, I.F. Charo, C.A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L.H. Miller, J.J. Oppenheim & C.A. Power. 2000. *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. *Pharmacological Reviews*, 52(1), 145-176.
- [102] Myhr, E. & S. Høie. 1999. *Yersiniose*. In: Poppe, T. (ed), *Fiskehelse og Fiskesykdommer*. Universitetsforlaget, Oslo, Norway, 94-96.
- [103] Nagae, M., H. Fuda, K. Ura, H. Kawamura, S. Adachi, A. Hara & K. Yamauchi. 1999. *The effect of cortisol administration on blood plasma*

immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (Oncorhynchus masou). Fish Physiology and Biochemistry, 13(1), 41-48.

- [104] Nakanishi, T., U. Fischer, J.M. Dijkstra, S. Hasewaga, T. Somamoto, N. Okamoto & M. Ototake . 2002. *Cytotoxic T cell function in fish*. Developmental and Comparative Immunology, 26, 131-139.
- [105] Neiffer, D.L. & M.A. Stamper. 2009. *Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Concentrations, Methods, and Types of Drugs*. ILAR Journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, 50(4), 343-360.
- [106] Neumann, N.F., J.L. Stafford, D. Barreda, A.J. Ainsworth & M. Belosevic. 2001. *Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defence*. Developmental and Comparative Immunology, 25, 807-825.
- [107] NORM/NORM-VET. 2012. *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø / Oslo 2013. ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).
- [108] Palaksha, K.J., G.W. Shin, Y.R. Kim & T.S. Jung. 2008. *Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (Paralichthys olivaceus)*. Fish and Shellfish Immunology, 24, 479-488.
- [109] Pangiello, K.B., N.C. Bols & L.E. Lee. 2002. *Effect of corticosteroids on viability and proliferation of the rainbow trout monocyte / macrophage cell line, RTS11*. Fish and Shellfish Immunology, 12, 199-214.
- [110] Pickering, A.D. 1981. *Stress and Fish*. Academic Press.
- [111] Pickering, A.D. 1987. *Stress response and disease resistance in farmed fish*. I Aqua Nor 87, conference 3: Fish diseases - a threat to the international fish farming industry. Norske Fiskeoppdretters Forening, Trondheim, Norway, 35-49.
- [112] Pickering, A.D. 1989. *Factors affecting the susceptibility of salmonid fish to disease*. I: Fifty-seventh annual report for the year ended 31st March 1989. Ambleside, UK, Freshwater Biological Association, 61-80. (Annual Report, Freshwater Biological Association, Ambleside).
- [113] Pickering, A.D. & T.G. Pottinger. 1983. *Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, Salmo trutta L*. General and Comparative Endocrinology, 49(2), 232-239.
- [114] Pickering, A.D. & T.G. Pottinger. 1989. *Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol*. Fish Physiology and Biochemistry, 7(1-6), 253-258.

- [115] Pickford, G.E., A.K. Srivastava, A.M. Slicher & P.K.T. Pang. 1982. *The stress response in the abundance of circulating leukocytes in the killifish, Fundulus heteroclitus I. The cold-shock sequence and the effects of hypophysectomy.* Journal of Experimental Zoology, 177(1), 89–96.
- [116] Press, C.M., B.H. Dannevig & T. Landsverk. 1994. *Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (Salmo salar L.).* Fish and Shellfish Immunology 4, 79-93.
- [117] Press, C.M. & A. Lillehaug. 1995. *Vaccination in european salmonid aquaculture: A review of practices and prospects.* The British Veterinary Journal, 151(1), 45-69.
- [118] Press, C.M. & T.Ø. Jørgensen. 1999. *Fiskens immunsystem. I: Poppe, T. (ed), Fiskehelse og Fiskesykdommer.* Universitetsforlaget, Oslo, Norway, 38-47.
- [119] Press, C.M. & Ø. Evensen. 1999. *The morphology of the immune system in teleost fishes.* Fish and Shellfish Immunology 9, 309-318.
- [120] Press, C.M., Ø. Evensen, L.J. Reitan & T. Landsverk. 1996. *Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon Salmo salar L., following different routes of administration.* Journal of Fish Diseases 19, 215–224.
- [121] Rahman, M.M. & G. McFadden. 2006. *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens.* PLoS Pathogen, 2(2),e4, doi:10.1371/journal.ppat.0020004.
- [122] Raida, M.K., J. Nylén, L. Holten-Andersen & K. Buchmann. 2011. *Association between Plasma Antibody Response and Protection in Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss Immersion Vaccinated against Yersinia ruckeri.* PLoS ONE 6(6): e18832. doi:10.1371/journal.pone.0018832.
- [123] Randall, D.J. & S.F. Perry 1992. *Catecholamines.* In W.S. Hoar and D.J. Randall (eds.) Fish physiology, 12B, 255-300. Academic Press, New York.
- [124] Randelli, E., F. Buonocore & G. Scapigliati. 2008. *Cell markers and determinants in fish immunology.* Fish and Shellfish Immunology 25, 326-340.
- [125] Reid, S.G., N.J. Bernier & S.F. Perry. 1998. *The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 120(1), 1-27.

- [126] Reid, S.G., M. Furimsky & S.F. Perry. 1994. *The effects of repeated physical stress or fasting on catecholamine storage and release in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. Journal of Fish Biology. 45: 365-378.
- [127] Reid, S.G., M.M., Vijayan & S.F. Perry. 1996. *Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. Journal of Comparative Physiology B, 165(8), 665-676.
- [128] Reiter, I., B. Krammer & G. Schwambergert. 1999. *Cutting Edge: Differential Effect of Apoptotic Versus Necrotic Tumor Cells on Macrophage Antitumor Activities*. The Journal of Immunology, 15(4), 1730-1732.
- [129] Reyes-Cerpa, S., K. Maisey, F. Reyes-López, D. Toro-Ascuy, A.M. Sandino & M. Imarai. 2012. *Fish cytokines and immune response*. New Advances and Contributions to Fish Biology, Prof. Hakan Turker (Ed.), ISBN: 978-953-51-0909-9, DOI: 10.5772/53504.
- [130] Robertsen, B. 2006. *The interferon system of teleost fish*. Fish and Shellfish Immunology 20, 172-191.
- [131] Robertsen, B., V. Bergan, T. Roekenes, R. Larsen & A. Albuquerque. 2003. *Atlantic salmon interferon genes, cloning, sequence analysis, expression, and biological activity*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 23, 601-612.
- [132] Roberts, R.J. 2012. *Fish Pathology*. Fourth Edition. Blackwell Publishing Ltd.
- [133] Rodgers, C.J. 1992. *Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies*. Journal of Fish Diseases, 15, 243–254.
- [134] Rucker, R. 1966. *Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)*. Bulletin De L' Office International des Epizooties, 65, 825–830.
- [135] Saeij, J.P., B.M.L. Verburg-van Kemenade, W.B. van Muiswinkel & G.F. Wiegertjes. 2003. *Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: In vitro modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis*. Developmental and Comparative Immunology, 27, 233-245.
- [136] Salgado-Miranda, C., E. Loza-Rubio, E. Rojas-Anaya & G. García-Espinosa. 2013. *Viral vaccines for bony fish: past, present and future*. Expert Review of Vaccines, 12(5), 567-578.
- [137] Salinas, I., Y.-A. Zhang & O. Sunyer. 2011. *Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish*. Developmental and Comparative Immunology, 35(12), 1346–1365.

- [138] Sangrador-Vegas, A. S.A. Martin, P.G. O'Dea & T.J. Smith. 2000. *Cloning and characterization of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) type II interleukin-1 receptor cDNA*. European Journal of Biochemistry 267, 7031-703.
- [139] Savan, R. & M. Sakai. 2006. *Genomics of fish cytokines*. Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics, 1(1), 89-101.
- [140] Scanvacc. *Aqui-S vet.*. <http://www.scanvacc.com/scanvacc/aqui-s-vet/>
- [141] Scapigliati, G. 2013. *Functional aspects of fish lymphocytes (rev.)*. Developmental and Comparative Immunology, 41, 200-208.
- [142] Schreck, C.B. 2010. *Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis*. General and Comparative Endocrinology, 165(3), 549-556.
- [143] Secombes, C.J. 1996. *The nonspecific immune system: cellular defenses*. I: The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment, Iwama, G. og T. Nakanishi, 63-103. San Diego: Academic Press.
- [144] Secombes, C.J. & M.J. Manning. 1980. *Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians. I. Antigen localization in the carp Cyprinus carpio*. Journal of Fish Diseases 3, 399-412.
- [145] Secombes, C.J. & T.C. Fletcher. 1992. *The role of phagocytes in the protective mechanisms in fish*. Annual Review of Fish Disease 2, 53-71.
- [146] Secombes, C.J., T. Wang, S. Hong, S. Peddie, M. Crampe, K.J. Laing, C. Cunningham & J. Zou. 2001. *Cytokines and innate immunity of fish*. Developmental and Comparative Immunology, 25(8-9), 713-723.
- [147] Sink, T.A., S. Kumaran & R.T. Lochmann. 2007. *Development of a whole-body cortisol extraction procedure for determination of stress in golden shiners, Notemigonus crysoleucas*. Fish Physiol Biochem. 33: 189-193. DOI 10.1007/s10695-007-9130-0.
- [148] Sinyakov, M.S., M. Dror, H.M. Zhevelev, S. Margel & R.R. Avtalion 2002. *Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish*. Vaccine, 20, 3668-3674.
- [149] Sizemore, R.G., N.W. Miller, M.A. Cuchens, C.J. Lobb & L.W. Clem. 1984. *Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish*. Journal of Immunology, 133, 2920-2924.
- [150] Small, B.C. 2003. *Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 218(1-4), 177-185.

- [151] Small, B.C. 2004. *Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors*. *Aquaculture*, 238(1-4), 469–481.
- [152] Snieszko, S.F. 1974. *The effect of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *Journal of Fish Biology*, 6, 197-208.
- [153] Statistisk sentralbyrå. 2012. *Akvakultur, 2012, foreløpige tall*. Hentet 21.10.2013. <http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett>.
- [154] Stolte, E.H., S.B. Nabuurs, N.R. Bury, A. Sturm, G. Flik, H.F. Savelkoul & B.M.L. Verburg-van Kemenade. 2008. *Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines*. *Molecular Immunology*, 46, 70-79.
- [155] Subramanian, S., C. Stansberg, L. Olsen, J. Zou, C.J. Secombes & C. Cunningham. 2002. *Cloning of *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA*. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 415-431.
- [156] Sumpter, J.P. 1997. *The Endocrinology of Stress*. I: Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck (ed.) *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Society for experimental biology seminar series 62.
- [157] Tafalla, C., A. Figueras & B. Novoa. 2001. *Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophage nitric oxide production*. *Disease of Aquatic Organism* 47, 101-107.
- [158] The College of Physicians of Philadelphia. *How vaccines work*. <http://www.historyofvaccines.org/content/how-vaccines-work>.
- [159] Thomas, p. & L. Robertson. 1991. *Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate*. *Aquaculture*, 96(1), 69–86.
- [160] Tsujii, T. & S. Seno. 1990. *Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (Teleost): morphologic studies on its formation and possible function*. *Anatomical Record* 226, 460–470.
- [161] Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez & G. Morgan. 2003. *Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review*. *Veterinarni Medicina*, 56(10): 486-503.
- [162] Verburg-VanKemenade, B.M.L., E.H. Stolte, J.R. Metz & M. Chadzinska. 2009. *Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish*. *Fish Physiology*, 28, 313–364.

- [163] Wang, T., W. Huang, M.M. Costa & C.J. Secombes. 2011. *The gamma-chain cytokine/receptor system in fish: more ligands and receptors*. Fish and Shellfish Immunology, 31(5), 673-687.
- [164] Wedemeyer, G.A. 1970. *The role of stress in the disease resistance in fish*. American Fisheries Society Special Publications, 5, 30-35.
- [165] Wedemeyer, G.A., B.A. Barton & D.J. McLeay. 1990. *Stress and acclimation*. I: C.B. Schreck og P.B. Moyle (eds.) Methods for fish biology, 451-489. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- [166] Wedemeyer, G.A. & D.J. McLeay. 1981 *Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors*. I: A.D. Pickering (ed.), Stress and fishes, 247-275. Academic Press, New York.
- [167] Wedemeyer, G.A., D.J. McLeay & C.P. Goodyear. 1984. *Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: The problems and methods for monitoring*. I: Cairns, V.W., P.V. Hodson og J.O. Nriagu (eds.) Contaminant effects on fisheries. Wiley and Sons, New York, 163-195.
- [168] Wedemeyer, G.A. & W.T. Yasutake. 1977. *Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health*. U.S. Fish and Wildlife Service Technical Reports, 89.
- [169] Wei, L., A. Laurence, K.M. Elias & J.J. O'Shea. 2007. *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. Journal of Biological Chemistry, 282, 34605-34610.
- [170] Wendelaar Bonga, S.E. 1997. *The stress response in fish*. Physiological reviews, 77(3), 591-625.
- [171] Wendelaar Bonga, S.E. 2011. *Hormonal responses to stress*. I: Anthony, P.F. (ed), Encyclopedia of Fish Physiology, Academic Press, San Diego, 1515-1523.
- [172] Whyte, S.K. 2007. *The innate immune response of finfish: A review of current knowledge*. Fish and Shellfish Immunology 23, 1127-1151.
- [173] Wilson, M., E. Bengten, N.W. Miller, L.W. Clem, L. Du Pasquier & G.W. Warr. 1997. *A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(9), 4593-4597
- [174] Wojtaszek, J., D. Dziewulska-Szwajkowska, M. Lozinska-Gabska, A. Adamowicz & A. Dzugaj. 2002. *Hematological Effects of High Dose of Cortisol on the Carp (Cyprinus carpio L.): Cortisol Effect on the Carp Blood*. General and Comparative Endocrinology, 125(2), 176-183.

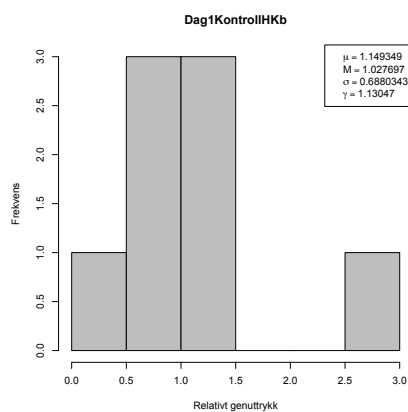
- [175] Yin, Z., T.L. Lam & Y.M. Sin. 1997. *Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, Clarias gariepinus, as a defence against Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 7, 93-104.
- [176] Young, G., B.T. Björnsson, P. Prunet, R.J. Lin & H.A. Bern. 1989. *Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (Oncorhynchus kisutch): Plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol*. General and Comparative Endocrinology, 74, 335-345.
- [177] Zahl, I.H., O. Samuelsen & A. Kiessling. 2012. *Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare*. Fish Physiology and Biochemistry, 38, 201-218.
- [178] Zapata, A. & E.L. Cooper. 1990. *The Immune System: Comparative Histophysiology*. John Wiley and Sons, Chichester.
- [179] Zhang, Y-A., I. Salinas, J. Li, D. Parra, S. Bjork, Z. Xu, S.E. LaPatra, J. Bartholomew & J.O. Sunyer. 2010. *IgT, a primitive immunoglobulin class species in mucosal immunity*. Nature immunology, 11(9), 827-835.
- [180] Zhou, H., T.B. Stuge, N.W. Miller, E. Bengten, J.P. Naftel, J.M. Bernanke, V.G. Chinchar, L.W. Clem & M. Wilson. 2001. *Heterogeneity of channel catfish CTL with respect to target recognition and cytotoxic mechanisms employed*. The Journal of Immunology, 167, 1325-1332.
- [181] Zou, J., S. Peddie, G. Scapigliati, Y. Zhang, N.C. Bols, A.E. Ellis & C.J. Secombes. 2003. *Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*. Developmental and Comparative Immunology, 27, 813-822.

Tillegg A

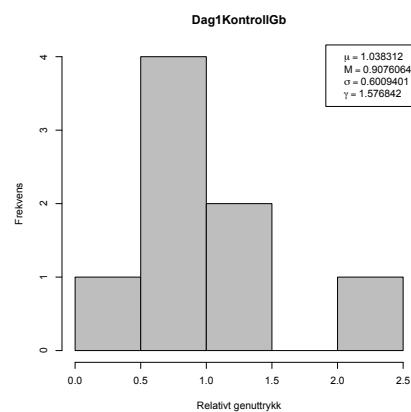
Resultater

A.1 Interleukinrespons

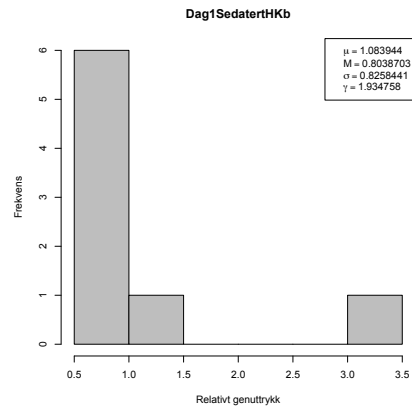
Fordelingene til $\Delta\Delta\text{Ct}$ -resultatene (relativt genuttrykk) er visualisert ved hjelp av histogram. Føgende tegn er: μ = gjennomsnitt, M = median, σ = standardavvik, γ = skjevhet.



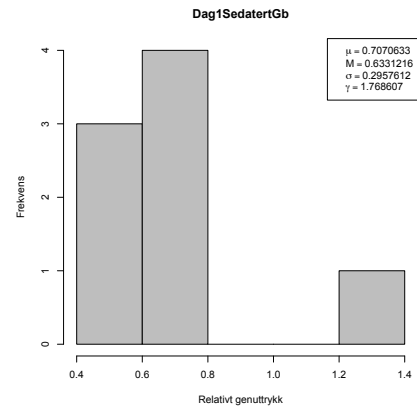
Figur A.1: Dag 1, Ikke sedatert, Hodenyre, IL-1 β



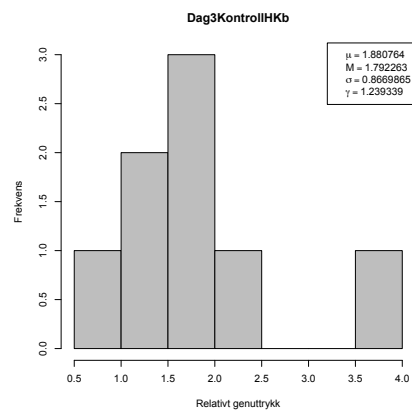
Figur A.2: Dag 1, Ikke sedatert, Gjeller, IL-1 β



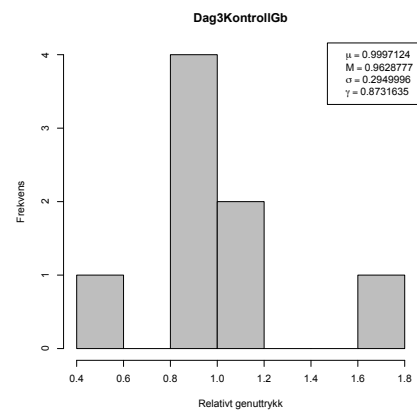
Figur A.3: Dag 1, Sedatert, Hordenyre, IL-1 β



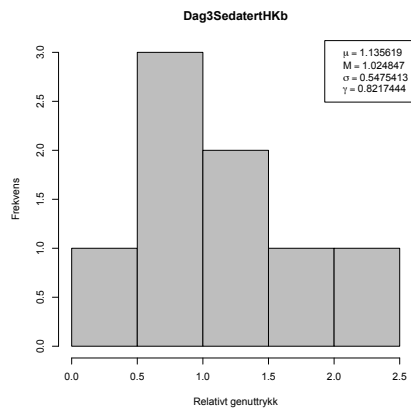
Figur A.4: Dag 1, Sedatert, Gjeller, IL-1 β



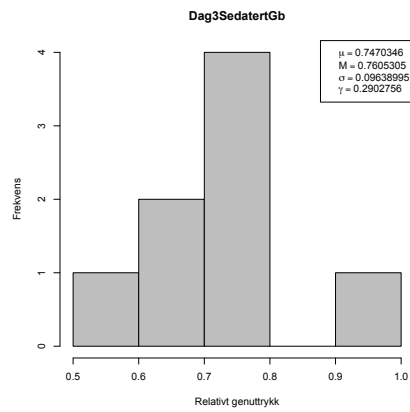
Figur A.5: Dag 3, Ikke sedatert, Hordenyre, IL-1 β



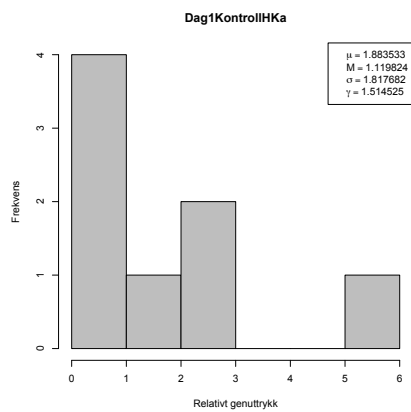
Figur A.6: Dag 3, Ikke sedatert, Gjeller, IL-1 β



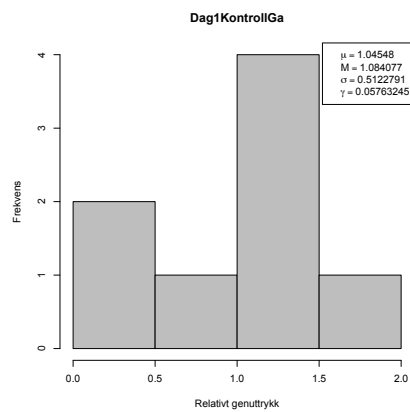
Figur A.7: Dag 3, Sedatert, Hodynyre, IL-1 β



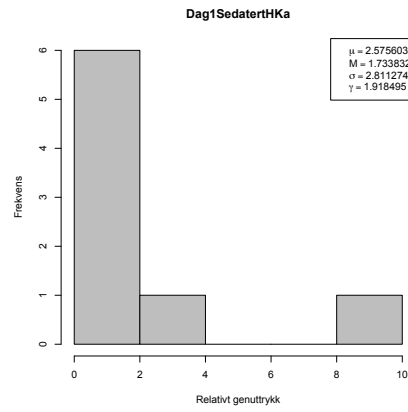
Figur A.8: Dag 3, Sedatert, Gjeller, IL-1 β



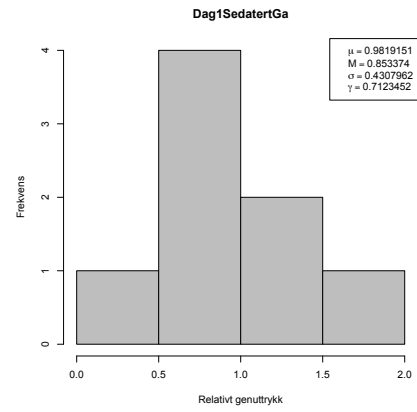
Figur A.9: Dag 1, Ikke sedatert, Hodynyre, IL-17 α



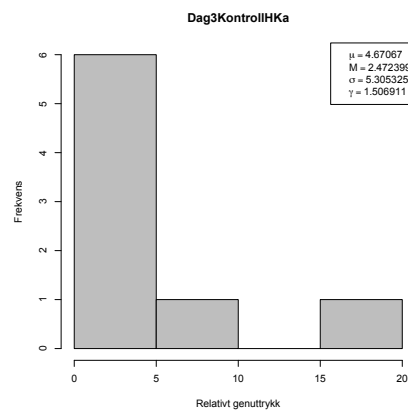
Figur A.10: Dag 1, Ikke sedatert, Gjeller, IL-17 α



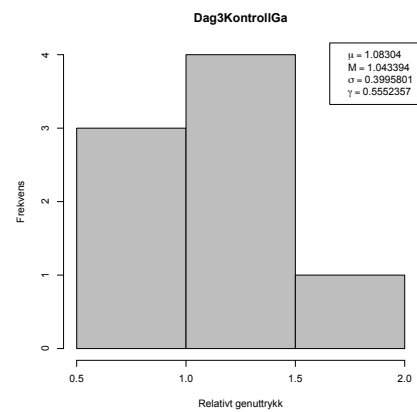
Figur A.11: Dag 1, Sedatert, Hohenyre, IL-17 α



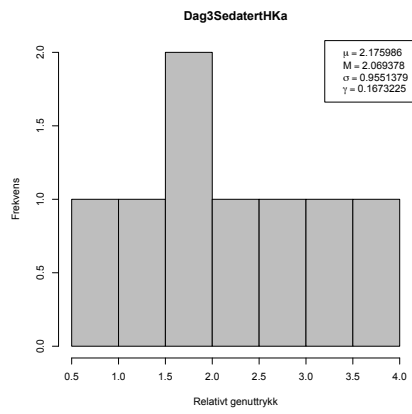
Figur A.12: Dag 1, Sedatert, Gjøller, IL-17 α



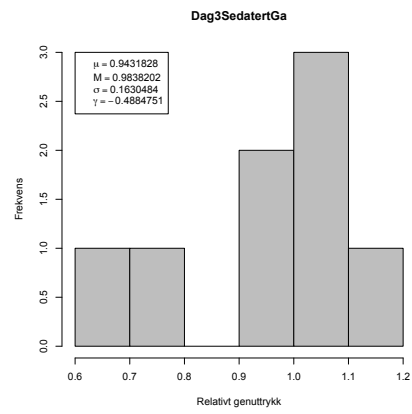
Figur A.13: Dag 3, Ikke sedatert, Hohenyre, IL-17 α



Figur A.14: Dag 3, Ikke sedatert, Gjøller, IL-17 α



Figur A.15: Dag 3, Sedatert, Hordenyre, IL-17α



Figur A.16: Dag 3, Sedatert, Gjeller, IL-17α

Tillegg B

Nøkkeldata Forsøk

B.1 Snittvekter

Snittvekter ble målt gjennom hele forsøksperioden. 1. gangs badevaksinering var 21.03.13 og 2. gangs badevaksinering var 29.04.13. Kar 1 var kontrollfisk, og står derfor alene.

Tabell B.1: Snittvekter til fiskene brukt i forsøket gitt i gram.

Dato	07.03.13	21.03.13	04.04.13	13.04.13	27.04.13	01.05.13	13.05.13	27.05.13
Kar								
2	1.62	2.33	3.49	4.93	7.91	8.12	13.20	20.14
3	1.62	2.22	3.49	5.11	7.88	7.91	11.55	16.37
4	1.62	2.16	3.63	5.02	7.70	8.18	12.76	18.38
5	1.62	2.05	3.30	4.47	8.11	8.04	14.61	20.33
6	1.62	2.13	3.15	4.60	8.69	8.40	13.41	22.58
7	1.62	2.00	3.00	4.23	7.36	7.72	10.26	17.86
2-7	1.62	2.24	-	5.22	8.56	8.49	13.50	23.12
1	1.62	2.15	3.34	4.73	7.97	8.06	12.63	19.83

B.2 Antall Fisk Brukt til Kortisolanalysering

Tabellene viser antall fisk brukt til kortisolanalysering.

Tabell B.2: Antall fisk analysert under kortisolanalysering ved 1. gangs badevaksinering.

Tid	Pre-stress	Ikke sedatert	Sedatert
	6		
1		18	17
3		16	17
6		16	11
12		16	15
24		18	16
28		17	14

Tabell B.3: Antall fisk analysert under kortisolanalysering ved 2. gangs badevaksinering.

Tid	Pre-stress	Ikke sedatert	Sedatert
	7		
1		17	18
3		18	18
6		18	18
12		18	18
24		18	18
28		18	18

